

- [10] International Publication No.: WO01/72993
- [43] International Publication Date: October 4, 2001
- [21] International Application No.: PCT/JP01/02869
- [22] International Filing Date: April 2, 2001
- [30] Priority Data: Japanese Patent Application No.
2000-99617
Priority Date: March 31, 2000
Country: Japan
Priority Data: Japanese Patent Application No.
2000-356719
Priority Date: November 22, 2000
Country: Japan
Priority Data: U.S. Patent Application No.
09/806,158
Priority Date: March 28, 2001
Country: U.S.A.
- [71] Applicant (for all designated States except US):
MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.,
Shinjuku-ku, Tokyo 160-8515 (JP)
- [72] Inventors; and
- [75] Inventors/Applicants (for us only): S. FURUSAKO
[JP/JP] et al.
c/o Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.,
Shinjuku-ku, Tokyo 160-8515 (JP)
- [54] Title of the Invention:
TLR/CD14 BINDING INHIBITOR

* * * * *



(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年10月4日 (04.10.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/72993 A1

(51)国際特許分類⁷: C12N 15/00, C07K 7/08, 14/705,
16/28, A61K 45/00, A61P 31/04, A61K 38/02, 39/395,
A61P 43/00, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/577

東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内
Tokyo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP01/02869

(74)代理人: 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.);
〒101-0032 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 Tokyo (JP).

(22)国際出願日: 2001年4月2日 (02.04.2001)

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25)国際出願の言語: 日本語

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26)国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(30)優先権データ:
特願2000-99617 2000年3月31日 (31.03.2000) JP

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

特願2000-356719

2000年11月22日 (22.11.2000) JP
09/806,158 2001年3月28日 (28.03.2001) US

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 持田製
薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒160-8515 東京都新宿区四谷一丁目7
番地 Tokyo (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 古迫正司 (FU-
RUSAKO, Shouji) [JP/JP], 森 貞夫 (MORI, Sadao)
[JP/JP], 白川嘉門 (SHIRAKAWA, Kamon) [JP/JP], 高
橋智裕 (TAKAHASHI, Tomohiro) [JP/JP]; 〒160-8515

(54)Title: TLR/CD14 BINDING INHIBITOR

(54)発明の名称: TLR/CD14結合阻害剤

(57)Abstract: An anti-CD14 antibody having a function of inhibiting the binding of CD14 to Toll like receptor (TLR) and its fragment; a hybridoma producing this antibody or its fragment; a process for producing a peptide or the antibody; a CD14 modification polypeptide; a method of screening a remedy for sepsis; and medicinal compositions for sepsis.

(57)要約:

WO 01/72993 A1

本発明は、CD14とToll Like Receptor (TLR)との
結合を阻害する機能を有する抗CD14抗体及びその断片、該抗体または断片を
产生するハイブリドーマ、ペプチド、抗体の作成方法、CD14改変体ポリペプ
チド、敗血症治療薬のスクリーニング方法並びに敗血症用医薬組成物を提供する

()

{ }

明細書

TLR/CD14結合阻害剤

技術分野

本発明は、CD14とToll Like Receptor（以下TLRという）との結合を阻害する機能を有する抗CD14抗体及びその断片、該抗体または断片を産生するハイブリドーマ、ペプチド、抗体の作成方法、CD14改変体ポリペプチド、敗血症治療薬のスクリーニング方法並びに敗血症用医薬組成物に関する。

背景技術

CD14は、356個のアミノ酸からなる糖蛋白であり、グリコシルホスファチジルイノシトール（glycosylphosphatidylinositol: GPI）によりマクロファージ、単球、クッパー細胞、好中球および一部B細胞の膜上にアンカリングされて存在する。

ヒトCD14は、膜結合型CD14（以下mCD14ともいう）のほかに可溶型CD14（以下sCD14または可溶性CD14ともいう）がある。そして血中には分子量の異なる複数のsCD14が存在することが報告されている（La beta MO : Eur. J. Immunol., 23: 2144, 1993）。

ヒトCD14は、グラム陰性桿菌内毒素のLPS受容体として知られており（

Wrightら: Science, 249: 1431, 1990)、血中のLB P (LPS binding protein) からLPSを受け取り、複合体を形成する。

mCD14を発現しているマクロファージ等は、LPSとsCD14の複合体により活性化され、炎症性サイトカインの産生を誘導する (Hailmann Eら: J. Immunol., 156: 4384, 1996)。

mCD14を発現していない血管内皮細胞や血管平滑筋細胞は、sCD14と LPSの複合体 (以下sCD14/LPSともいう) により炎症性サイトカインの産生が誘導される (Loppnow Hら: Infection & Immunity, 63: 1020, 1995)。

また、グラム陰性菌ばかりでなくグラム陽性菌の菌体成分やマイコバクテリアにも反応し、リポタイコ酸 (LTA) 、ペプチドグリカン (PeptG) 等の受容体として機能し、細胞の炎症性サイトカインの産生を誘導する (Cleveland MGら: Infect immunity, 64: 1906, 1996)。

LPSまたはLTA等のCD14を介する細胞のサイトカイン産生は、生体に障害的な作用を及ぼし、敗血症を引き起こす。一般に、敗血症の初期症状には悪寒、多汗、発熱、衰弱等がみられ、引き続いてショックを起こす低血圧、好中球減少症、汎発性血管内血液凝固症候群、成人性呼吸窮迫症候群、呼吸不全、多臓器不全等、重篤な臨床症状が生じる。

ヒトCD14のLPSのシグナルを細胞に伝達する機能は、その領域が一部明らかになっている。N末端1~152番目がCD14の機能発現に必須な領域で

あり (Juan TS ら: J. Biol. Chem., 270: 1382, 1995)、また7~14番目および57~64番目がLPSとの結合に必須な部分である (Juan TS : J. Biol. Chem., 270, 29: 17237 (1995) および Juan TS : J. Biol. Chem., 270, 10: 5219 (1995))。

しかし、ヒトCD14のN末端153番以降の有する機能については、まったく明らかになっていない。

また、CD14/LPSの細胞へのシグナル伝達におけるToll-like receptor (TLR) の関与が近年研究されている。現在までにヒトTLR1、2、3、4及び5 (Fernand R : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 588, 1998)、TLR6 (Takeuchi O: Gene, 231: 59, 1999)、TLR 7、8、9および偽遺伝子 (Chuang TH: Eur. Cytokine Netw., 11: 372, 2000) の合計10種のTLR family遺伝子がクローニングされている。

TLR 2若しくはTLR 4を欠損したマウスによる研究により、TLR 4がグラム陰性菌菌体成分の細胞へのシグナル伝達を、TLR 2がグラム陽性菌菌体成分の細胞へのシグナル伝達を担っている可能性があることが報告されている (Takeuchi Oら: Immunity, 11: 443, 1999)。またTLR 4がLPSの細胞内へのシグナル伝達に関与すること、さらにTLR 4が細胞表面上でLPSに直接反応すること、CD14存在下では反応が増強されることが報告されている (Ruey-Bing Y : Nature, 395: 28

4, 1998）。また最近TLR4と結合するMD2が発見された（Rintaro Shimazu : J. Exp. Med., 189, 1777, 1999）。MD2は160アミノ酸からなる分泌蛋白質であるが、マウス細胞ではTLR4はMD2存在下ではじめてLPSシグナル伝達を行うことが報告されている。MD2のLPSシグナル伝達における正確な役割は未解明であるがTLR4もしくはTLR4の2量体の構造の安定化に寄与していると考えられている（Alan Aderem, Nature, 406, 782, 2000）。またマウスTLR4とMD2の複合体を認識する抗体はLPSによるTNF- α や一酸化窒素の産生を特異的に抑制することも報告されている（Akasaki S., J. Immunol. 164, 3471, 1999）。

またマウスにおいてはTLR4のスプライスバリエントの可溶性TLR4が報告された。そしてこの86アミノ酸残基からなる可溶性TLR4はLPSによる細胞の活性化を抑制する活性を示したことが報告されている。（Iwamiki, J. Immunol., 165, 6682, 2000.）

しかしながらCD14とTLRとの相互作用において、CD14がTLRもしくはTLRと他の機能の解明されていない低分子物質であるアクセサリーモデル複合体と直接結合するか否かは明らかになっておらず、さらにTLRとCD14の結合領域もまったく未知である。

LPSのヒトCD14を介するシグナル伝達を制御するヒト抗CD14抗体として、ヒトCD14の7～14番目に結合する3C10抗体（Steinmann : J. Exp. Med., 158:126 (1983) およびJuan TS : J. Biol. Chem., 270:29, 17237 (1995) ）およ

び57～64番目に結合するMEM-18抗体 (Bazil : Eur. J. Immunol., 16: 1583 (1986) およびJuan TS : J. Biol. Chem., 270, 10, 5219 (1995)) が知られており、敗血症治療薬への応用が開示されている。

さらに、LPSの結合を抑制し、サイトカインの放出を抑制する28C5抗体および23G4抗体、並びにLPSの結合は一部しか抑制せず、サイトカインの放出を抑制する18E12抗体（特表平8-510909号）が開示されている。

また、グラム陽性細菌及びマイコバクテリアとの作用に対する抗CD14抗体も開示されている（特表平10-505839号）。

しかし敗血症治療薬として用いる場合、LPSの結合領域を認識する抗体、またはLPSの結合を抑制する抗体は、すでに形成したLPS/CD14のシグナル伝達を抑制する効果は期待できない。また、LPSのCD14への結合を特異的に阻害するため、グラム陽性菌の菌体成分及びマイコプラズマ等によるシグナル伝達を抑制する効果も期待できない。また、18E12抗体はCD14の認識部位が明らかになっておらず、サイトカインの放出を抑制する機序も不明である。

ヒトCD14のLPSとの結合部位に着目した抗炎症性ペプチドとして、CD14のN末端から7～10、11～14及び57～64番目のアミノ酸をベースとする抗炎症性ペプチド（特表平10-511954）が開示されている。これらのペプチドはLPSと結合能を有するためLPSを除去するものであり、既に形成されているCD14/LPSの細胞内へのシグナル伝達は抑制しない。

また、ヒトCD14のLPSとの結合部位を改変した抗炎症性ペプチドとして、CD14のN末端から7～10番目に天然型配列とは異なるアミノ酸を有するか、またはCD14のN末端から1～14番目が欠失している可溶性CD14関連ポリペプチドを含む抗炎症性ポリペプチド（特表平10-512142）が開示されている。これらのペプチドは、LPSとの結合部位が改変されているため、LPSのシグナルの細胞内への伝達を抑制するものである。しかし、既に形成されているCD14/LPSの細胞内へのシグナル伝達は抑制しない。

すなわち、従来におけるCD14の機能を抑制するものは特定の細菌菌体成分とCD14との結合を阻害する物質であり、これらは他の細菌菌体成分との結合を阻害することは難しく、また既に形成されたCD14/LPSのシグナル伝達を抑制する効果は期待できない。

また上記のとおり、CD14/LPSの細胞へのシグナル伝達におけるTLRの関与が知られているが、この関与を阻害する物質が、シグナル伝達を調節することが可能か否かは定かではなく、また阻害する物質はまったく知られていない。

本発明の課題は、すでに形成されたCD14/LPSであっても細胞内へのシグナル伝達を調節しうるCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する物質、その作成方法、敗血症治療薬のスクリーニング方法、敗血症用医薬組成物を提供することである。

発明の開示

発明者らは、上記のような従来の問題点を克服するため銳意検討を行い、CD14とTLRとの結合を阻害する抗CD14抗体を提供する。また抗CD14抗体が該作用をするために必要な認識領域のヒトCD14における特定により、その特定領域を用いた抗体の作成方法を提供する。

さらにCD14とTLRとの結合を阻害するCD14改変体ポリペプチドを提供する。またこのCD14改変体ポリペプチドの作成方法を提供する。

またCD14と被検物質との接触をTLRの存在下に行う新規な敗血症治療薬のスクリーニング方法、およびCD14とTLRとの結合を阻害する物質を有効成分とする敗血症用医療組成物を提供する。

すなわち本発明では、下記(1)～(11)の抗CD14抗体が提供される。

(1) 配列番号1に記載のヒトCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識し、CD14とToll Like Receptor(TLR)との結合を阻害する機能を有する抗CD14抗体。

(2) モノクローナル抗体である(1)の抗体。

(3) 上記(2)の抗体のFab、Fab'または(Fab')₂である断片。

(4) ハイブリドーマF1024-1-3(受託番号P-18061)により產生されるF1024-1-3モノクローナル抗体。

(5) 上記(2)～(4)のいずれかに記載の抗体若しくは抗体の断片を產生するハイブリドーマ。

(6) 配列番号1に記載のヒトCD14の269番から315番までの領域のア

ミノ酸を連続して8個以上含むペプチド。

(7) 上記(6)に記載のペプチドを免疫原として用いる抗体の作成方法。

(8) CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有し、以下①または②のいずれかであるCD14改変体ポリペプチド：

①配列番号1に記載のアミノ酸配列のN末端が1～6番目のいずれかであり、C末端が246～306番目のいずれかのアミノ酸配列を有する、

②配列番号1に記載のアミノ酸配列のN末端が1～6番目のいずれかであり、C末端が269～356番目のいずれかであり、かつ269～307番目のアミノ酸のいずれか一つ以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する。

いうまでもないが、上記のCD14改変体ポリペプチドは、CD14ポリペプチドが改変されたものでもよいが、化学的に合成されたものでも、遺伝子工学的に人工的に発現されたものでもよく、その製造方法には限定されない。

(9) 上記(8)①において、C末端が246～285番目のいずれかである(8)に記載のCD14改変体ポリペプチド。

(10) 上記(8)の②において、C末端が269～356番目のいずれかであり、かつ269～307番目のアミノ酸のいずれか一つ以上がLeu、Ala、CysまたはGlyに置換された(8)のCD14改変体ポリペプチド。

(11) 上記(8)～(10)のいずれかに記載のCD14改変体ポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有するCD14改変体ポリペプチド

(12) 上記(8)～(11)のいずれかに記載のCD14改変体ポリペプチド

をコードする遺伝子。

(13) 以下の①または②のDNAからなる遺伝子。

①配列番号4～6のいずれかに記載のDNA

②配列番号4～6のいずれかに記載のDNAとストリンジエントな条件下ハイブリダイズし、かつCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有するポリペプチドをコードするDNA

(14) 上記(12)または(13)の遺伝子を含有する組換えベクター。

(15) 上記(14)に記載の組換えベクターを含有する形質転換体。

(16) 上記(15)形質転換体を培養する工程を含むことを特徴とする上記(8)～(11)のいずれかに記載のCD14改変体ポリペプチドの製造方法。

(17) 血漿から得られる分子量36±5kDaのCD14低分子種。

(18) 抗体、抗体断片、ポリペプチドまたはCD14低分子種を含むCD14とTLRとの結合阻害剤。

(19) 遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞に、CD14及び被検物質を接触させ、特定の指標の変化を検出して、被検物質が敗血症用治療薬の候補となり得るか否かを判定する工程を含む敗血症治療薬のスクリーニング方法。

(20) 上記(18)または(19)のスクリーニング方法で得られた抗CD14抗体、CD14改変体若しくは低分子化合物。

(21) CD14とTLRとの結合阻害剤を有効成分として含む敗血症用医薬組成物。

図面の簡単な説明

第1図は、ヒトTLR4発現細胞におけるLPS／sCD14によるルシフェラーゼ誘導活性を示すグラフである。

HEK293はTLR4を発現していない細胞で、HEKT4-14はヒトTLR4を恒常に発現させた組換えHEK293細胞である。

第2図は、F1024-1-3抗体がLPS／CD14によるTLR4を介するNF- κ Bの活性化を抑制することを示しているグラフである。

尚、阻害活性は下記の通り算出した。

(抗体未添加時のルシフェラーゼ活性－抗体添加時のルシフェラーゼ活性)／抗体未添加時のルシフェラーゼ活性×100

第3図は、F1024-1-3抗体のLPS／CD14による内皮細胞でのIL-6産生抑制効果を示すグラフである。conAはコントロールのラットIgGを示している。

第4図は、F1024-1-3抗体のLPS／CD14複合体形成後の内皮細胞におけるIL-6産生抑制効果を示すグラフである。

第5図は、CD14発現細胞へのFITC-LPSの結合をF1024-1-3抗体が阻害しないことを示しているチャートである。

第6図は、F1024-1-3抗体のCD14(1-356)への結合を阻止する活性をもつペプチドを示している図である。

第7図は、F1024-1-3抗体の各種CD14欠失変体との結合活性を示している図である。

第8図は、F1024-1-3抗体の各種CD14アミノ酸置換変体との結

合活性を示している図である。

第9図は、ヒト可溶型CD14C末端欠失改変体ポリペプチドの分子量を抗ヒトCD14抗体（3C10およびMEM-18）を用いて行ったWestern Blottingの結果を示す図である。

Lane1よりLane6までそれぞれ、sCD14(1-356)、sCD14(1-307)、sCD14(1-285)、sCD14(1-246)、sCD14(1-183)、sCD14(1-152)を3C10カラムにて精製した標品を示す。

第10図は、ヒトCD14のC末端側のアミノ酸を欠失したCD14改変体ポリペプチド及び血清由来可溶型CD14低分子種のLPS/CD14による内皮細胞のIL-6産生阻害活性を示すグラフである。

sCD14(1-356)は全長型ヒト可溶性CD14を示す。

sCD14(1-307)、sCD14(1-285)、sCD14(1-246)、sCD14(1-183)及びsCD14(1-152)は、それぞれヒトCD14のN末端1~307番目、N末端1~285番目、N末端1~246番目、N末端1~183番目、N末端1~152番目のアミノ酸を有するCD14改変ポリペプチドを、血清由来可溶型CD14低分子種は健常人血清の3C10カラム精製品をさらにF1033-3-1カラム及びF1025-3-1カラムにて精製し、濃縮した標品を示す。

第11図は、sCD14(1-307)のアミノ酸を置換したCD14改変ポリペプチドのLPS/CD14による内皮細胞のIL-6産生阻害活性を示すグラフである。

s CD14 (1-307) D284A, s CD14 (1-307) S286A 及び s CD14 (1-307) C287Aはそれぞれ s CD14 (1-307) のN末端から284番目のアミノ酸AspをAlaに、N末端から286番目のSerをAlaに、及びN末端から287番目のアミノ酸CysをAlaに置換したCD14改変ポリペプチドを示す。

第12図は、s CD14 (1-307) のN末端から286番目のアミノ酸Serを置換したCD14改変ポリペプチドのLPS/CD14による内皮細胞のIL-6産生阻害活性を示すグラフである。

s CD14 (1-307) S286A, s CD14 (1-307) S286C 及び s CD14 (1-307) S286Gはそれぞれ s CD14 (1-307) のN末端から286番目のアミノ酸SerをAla, Cys, 及びGlyに置換したCD14改変ポリペプチドを示す。

第13図は、CD14改変ポリペプチドのLPSによる末梢マクロファージのTNF α 産生阻害活性を示すグラフである。

第14図は、CD14改変体ポリペプチドであるs CD14 (1-307) S286CのNF-kB活性化に対する抑制効果を示したグラフである。阻害活性の計算方法は図2と同様である。

第15図は、BIACORE 3000を用いてLPS/CD14/TLR4-COS複合体を形成させたときの結合量、F1024-1-3抗体を結合したときのTLR4-COSの結合抑制効果を示した図である。レスポンスはピアコア社の指標であり、1000RUが1.2ngの結合量を示すグラフである。

第16図は、BIACORE 3000を用いてLPS/CD14/TLR4-

COS複合体を形成させたときの結合量、CD14(s286c)をTLR4-COS細胞と反応させたときの結合抑制効果を示した図である。レスポンスはビアコア社の指標であり、1000RUが1.2ngの結合量を示すグラフである。

第17図は、CD14改変ポリペプチド(sCD14(1-307)S286A)のLPSとの結合能を示した結果を示す図である。

第18図は、ヒト血清由来のCD14ポリペプチドの分子量を抗ヒトCD14抗体(3C10及びMEM-18)を用いて行ったWestern Blottingの結果を示す図である。

Lane 1は健常人血清より3C10カラムによって精製した標品を、Lane 2は健常人血清の3C10カラム精製品をさらにF1033-3-1カラム及びF1025-3-1カラムにて精製し、濃縮した標品の結果である。

第19図は、ヒト血清由来のCD14ポリペプチドのLPS/CD14による細胞傷害抑制活性を示すグラフである。

血清由来可溶型CD14低分子種は、健常人血清の310カラム精製品をさらにF1033-3-1カラム及びF1025-3-1カラムにて精製し、濃縮した標品を示す。

第20図は、HEK-T4-14におけるIL-8の誘導産生に対するF1024-1-3及びsCD14(1-307)S286Cの抑制効果を示したグラフである。

尚、阻害活性は下記の通り算出した。

(抗体あるいは組換え体未添加時の IL-8 產生量—抗体あるいは組換え体添加時の IL-8 產生量) / 抗体あるいは組換え体未添加時の IL-8 產生量 × 100

第21図は、sCD14(1-307)のアミノ酸を置換したCD14改変ポリペプチド、3C10抗体及びF1024-1-3抗体のStaphylococcus aureus cell suspension/CD14によるU-373 MG細胞株のIL-6 產生阻害活性をグラフで示すグラフである。

第22図は、F1024-1-3抗体のイヌ、アカゲサル、カニクイサル、ウサギ、ヒトの可溶型CD14との交差反応性を示しているグラフである。

第23図は、F1024-1-3抗体のウサギCD14との結合をFluorocytometry法で検討した結果を示すチャートである。

第24図は、LPS負荷ウサギ敗血症モデルにおけるF1024-1-3抗体前投与によりTNFの產生が抑制されることを示すグラフである。

第25図は、LTA/Peptidoglycan投与ウサギ敗血症モデルにおけるF1024-1-3抗体前投与により白血球減少症が改善されることを示すグラフである。

第26図は、LPS負荷ウサギ敗血症モデルにおけるF1024-1-3抗体後投与によりALT、クレアチニンの数値が改善されることを示すグラフである。黒印は抗体投与群、白丸印は生食投与群を示す。

第27図は、マウスエンドトキシンショックモデルでのCD14改変ポリペプチドの効果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下に、より詳細に本発明を説明する。

本発明の第一の態様は、配列番号1に記載のヒトCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識し、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する抗CD14抗体である。

配列番号1に記載のアミノ酸配列はヒトCD14のアミノ酸配列である。また配列番号1に記載される356アミノ酸からなる蛋白質はヒトCD14の全長である。

ここで「エピトープ」とは抗原決定基であり、抗体と特異的に結合する構造部位をいう。

抗体が認識する領域は一次配列上連続したアミノ酸残基を認識するものとは限らず、蛋白質のとる立体構造を認識するエピトープを有する抗体もある（抗体の蛋白工学、1～4頁 三木敬三郎等編 講談社サイエンティフィック 1991年）。例えば、一次配列上不連続なアミノ酸残基を認識している抗体は、該不連続なアミノ酸残基が立体構造的には、抗体が認識するのに十分近い距離に存在するために、該不連続なアミノ酸残基をエピトープとする場合がある。

「ヒトCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープ」とは、ヒトCD14のアミノ酸配列の269番から315番に存在するエピトープをいう。例えばエピトープとして、該領域の一部の連続したアミノ酸が挙げられるが、上記したように、該領域の不連続なアミノ酸も含まれる。すなわちヒトCD14の269番から315番までの領域に存在する限り、連続若しくは不連続なアミノ酸の集合または連続若しくは不連続なアミノ酸が点在した2ヶ所以上

のアミノ酸の集合も「ヒトCD14の269番から315番までの領域の一部」に含まれる。

また本発明の抗体は、269番から315番以外の領域を含むエピトープを認識する抗体も含まれる。例えば、ヒトCD14の269番から315番までの領域の1以上のアミノ酸残基と、ヒトCD14の269番から315番まで以外の領域の数アミノ酸残基により形成されるエピトープを特異的に認識する抗体も含まれる。

本抗体の認識するエピトープがヒトCD14の269番から315番までの領域においては一アミノ酸残基であっても、そこを認識して結合することにより、ヒトCD14の269番から315番までの領域が有する特定の機能を変化させることができるからである。

本発明の抗体は、ヒトCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識し、ヒトCD14と結合する。ヒトCD14とはsCD14またはmCD14を問わない。また、どちらか一方のCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識する抗体も含まれる。例えばsCD14は、血中に存在し、mCD14はマクロファージに存在する。

ヒトCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識するとは、例えば、後述する実施例6の方法と同様に、ヒトCD14のN末端1～315番目のアミノ酸を有する可溶性ポリペプチド(sCD14(1～315))とは結合するがsCD14(1～268)と結合しないことにより、判断できる。

本発明の抗体は、ヒトCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識することにより、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する。

CD14は細菌菌体成分と結合し、その結合したCD14／細菌菌体成分複合体がTLRと結合し、シグナルを細胞に伝達し、細胞を活性化する。これらのシグナル伝達機構により細胞が活性化されると、細胞から炎症性サイトカインが放出され、細胞障害、敗血症等の炎症が惹起される。

本発明の抗体は、菌体成分による細胞活性化をCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有することにより抑制し、細胞障害、敗血症等の炎症を抑制する。

「CD14とTLRとの結合」を詳細に説明すると、CD14と細菌菌体成分とが結合したCD14／細菌菌体成分複合体とTLRとの結合である。細菌菌体成分には、LPS、LTA若しくはペプチドグリカン（PGN）若しくはリポアラビノマンナン等、マイコプラズマ等が挙げられる。例えばLPSとCD14が結合した複合体であるLPS／CD14はTLR、特にTLR2若しくはTLR4、と会合することにより、細胞へシグナルを伝達する。TLRにより細胞内へシグナルが伝達されると、MyD88、IRAK及びNIKを経由してNF- κ Bが活性化される等により、細胞の活性化が起こる。本発明の抗体はこの過程において、LPS／CD14とTLRとの結合の結合を阻害する。

「CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する」とは、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する限り限定はされないが、例えば後述する実施例2、13、14または20の系により測定し判断することができる。

また、本発明の抗体は、TLR発現細胞の細胞活性化を30%以上抑制する抗体が好ましい。

より具体的なアッセイ系においては、抗体の濃度が $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下で、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のLPS、 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ の外因性のCD14存在下でのTLR発現細胞のNF- κ Bの活性化若しくはIL-8産生を30%以上抑制する抗体が好ましい。より好ましくは、40%以上抑制する抗体である。さらに好ましくは50%以上抑制する抗体である。特に好ましくは70%以上抑制する抗体である。

また、本発明の抗体は、外因性のLPS/CD14による内皮細胞のサイトカインの産生を60%以下に抑制する抗体が好ましい。より具体的には、抗体の濃度が $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、 $10\text{ ng}/\text{mL}$ のLPS、 $300\text{ ng}/\text{mL}$ の外因性のCD14存在下での内皮細胞のIL-6産生を60%以下に抑制する抗体が好ましい。より好ましくは、40%以下に抑制する抗体である。

また、CD14とTLRとの結合には、直接的な結合、他の因子を介する結合または他の因子により活性化される結合が挙げられる。血中若しくはin vitroでは動物由来の血清存在下で結合する場合が挙げられる。例えば、MD2存在下で、TLR4若しくはTLR4の2量体の構造が安定した時に結合する場合が挙げられる。本発明の抗体は、いずれかの場合の結合を阻害する機能を有していればよい。例えば血中若しくはin vitroでは動物由来の血清存在下で、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する抗CD14抗体が挙げられる。

本発明の抗体がCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有するのは、該領

域がCD14とTLRとの結合に関連がある領域であるからである。このためヒトCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識する抗体は、該領域の機能を変化させることによりCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する。

また、CD14とTLRとの結合に関連がある領域として、エピトープとする領域が、ヒトCD14の269番から315番までに完全に含まれる抗体が好ましい。より好ましいエピトープとする領域は、実施例のF1024-1-3抗体と同様のエピトープを持つという面において、ヒトCD14の285番から315番までの領域である。また好ましくは、ヒトCD14の269番から307番までの領域である。

該領域の機能を変化させるという面では、本発明の抗体は、エピトープとして含まれる抗原の領域の一部が6アミノ酸以上である抗体が好ましい。より好ましくは8アミノ酸以上である。さらに好ましくは、連続したアミノ酸をエピトープとして特異的に認識する抗体が好ましい。

また、本発明の抗体は、実施例のF1024-1-3抗体と同様のエピトープを持つという面において、ヒトCD14の285番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識する抗体が好ましい。該抗体はCD14の294番目のアミノ酸がProであることによって生じ得る立体構造の285番目のアミノ酸より315番目のアミノ酸に存在するエピトープを認識する。

Proは他のアミノ酸と異なり α 炭素に結合したN原子が環構造に組み込まれ>NH基になっているため、ポリペプチドはPro骨格により1次構造が制限され、蛋白質の立体構造に影響を与える。すなわち、ProはNH基がないため水

素結合を形成できず、 α -ヘリクスを形成できない（プロテインバイオテクノロジー、F. フランク編、培風館）。該抗体がCD14の294番目のProをポイントミューテーションすることにより結合しなくなるが、これはCD14の立体構造が変化したことが原因である。すなわち、該抗体は、294番目のアミノ酸がProであることによって生じ得る立体構造の285番目のアミノ酸より315番目のアミノ酸に存在するエピトープを認識する。

また、本発明の抗体は抗ヒトCD14抗体であるが、該領域と同等のヒト以外の哺乳動物のCD14の領域に対する抗体であっても、後述する抗ヒトCD抗体と同等の効果を示す抗体であれば、本発明に含まれる。

配列番号2に記載のアミノ酸配列は、ヒトCD14の269番目から315番目のアミノ酸配列である。

この配列番号2に記載のアミノ酸配列の領域の一部若しくは全部からなり、連続した6以上のアミノ酸を有するペプチドを免疫原として作成される抗体は、本発明の抗体に含まれる。好ましくはヒトCD14の285番目から307番目までの領域のアミノ酸配列の一部若しくは全部からなり、連続した6以上のアミノ酸を有するペプチドを免疫原として作成された抗体である。またペプチドが立体構造をとることを考慮すると、連続した8以上のアミノ酸を有するペプチドを免疫原として作成される抗体が好ましい。さらに好ましくは連続した10以上、より好ましくは連続した15以上のアミノ酸を有するペプチドを免疫原として作成される抗体である。

本発明の抗体は、CD14と特異的に結合することにより、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する。CD14とはsCD14またはmCD14を

問わない。また、どちらか一方のCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する抗体も含まれる。例えば、血中に存在するsCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する抗体若しくはマクロファージ等に存在するmCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する抗体が挙げられる。

本発明の抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。抗体の有する機能を明確にするため、若しくは明確に發揮させるためには、モノクローナル抗体が好ましい。

本発明の抗体が由来する動物種は特に限定されない。抗体作成の容易さの面では、ラットが好ましい。医薬品組成物の構成物とされる場合は、ヒト抗体が好ましい。ヒト抗体には、ヒト抗体産生マウスに免疫して作製したヒト抗体も含まれる。この他にもヒト化抗体、ファージ抗体若しくはキメラ抗体等も本発明の抗体に含まれる。ヒト化抗体は、定常領域と、フレームワーク領域がヒト由来で、相補性決定領域が非ヒト由来である抗体である。ファージ抗体は纖維状ファージのコート蛋白質に抗体を融合させることによってファージ粒子表面上に抗体を提示させ、作製する抗体であり、単鎖Fv(scfv)フォームあるいはFabフォームが主に使用される。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウスのモノクローナル抗体の可変領域と、ヒト抗体の定常領域とからなる抗体である。

本発明の抗体はその分子種は特に限定されない。いずれのクラス、サブクラス及びイソタイプに分類される免疫グロブリンであってもよい。また、生物学的に活性のあるFab、Fab'、(Fab')₂等の抗体断片も、本発明に含まれる。

本発明の抗体は公知技術を用いることにより作製できる。例えば、モノクロー

ナル抗体は下記の方法で作製できる。

配列番号 1 に示されるアミノ酸の配列の全部の蛋白質または 269 番から 315 番までの領域の連続した 6 個以上からなるペプチドを免疫原として免疫した哺乳動物の免疫細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマの中から、後述する本発明の第十二の態様のスクリーニング方法により、クローンを選択することにより、本発明の抗体を作製することができる。また、 sCD14 (1-315) と結合し、 sCD14 (1-268) とは結合しないクローンを選択しても、本発明の抗体を作成することができる。好ましくは、 285 番から 307 番までの領域の連続した 6 個以上からなるペプチドを免疫原とすることである。また好ましくは連続した 8 個以上、より好ましくは連続した 10 個以上、特に好ましくは連続した 15 個以上のアミノ酸からなるペプチドを免疫原とすることである。

免疫する哺乳動物は、特に限定されないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して選択することが好ましく、マウス、ラットまたはハムスター等が好ましい。ミエローマ細胞は、公知の種々の細胞が使用可能である。これには P3、P3U1、SP2/O、NS-1、YB2/0 及び Y3-Ag1, 2, 3 等の骨髄種細胞が含まれる。

免疫は公知の方法により行なうことができる。例えば、抗原を腹腔内、皮下、静脈内またはフットパッド内に投与して行なう。この抗原の投与はアジュバントを併用してもよく、また複数回投与することが好ましい。免疫細胞は抗原の最終投与の数日後、例えば 3 日後に摘出した脾細胞またはリンパ節由来の細胞が好ましい。

免疫細胞とミエローマ細胞との融合は、Milstein等の方法（Methods in Enzymol., 73巻 3頁）等の公知の方法を用いて行なうことができる。例えば、融合剤としてポリエチレングリコール（PEG）を使用する方法または電気融合法等が挙げられる。

免疫細胞とミエローマ細胞との混合比は、それらが融合できる比率であれば限定されないが、免疫細胞に対し、ミエローマ細胞を1／10量ないし等量を使用することが好ましい。

細胞融合をPEG（平均分子量1,000～4,000）を使用して行なう方法ではPEG濃度は特に限定されないが50%で行なうことが好ましい。また、融合効率促進剤としてジメチルスルフォキシド（DMSO）等の補助剤を添加してもよい。

融合は37℃に加温したPEG溶液を混合した細胞に添加することにより開始し、1～5分間反応後、培地を添加することにより終了する。

この融合により形成されたハイブリドーマをヒポキサンチン、チミジン及びアミノブテリンを含む培地（HAT培地）等の選択培地で1日～7日間培養し、未融合細胞と分離する。得られたハイブリドーマをその產生する抗体により更に選択する。選択したハイブリドーマを公知の限界希釈法に従って单一クローン化し、单一クローン性抗体產生ハイブリドーマとして樹立する。

ハイブリドーマの產生する抗体の活性を検出する方法は公知の方法を使用することができる。例えばELISA法、凝集反応法、ラジオイムノアッセイ法が挙げられる。

樹立したハイブリドーマを公知の方法で培養し、その培養上清よりモノクロナ

ール抗体を得ることができる。また、ハイブリーマをこれと適合性を有する哺乳動物に投与して増殖し、その腹水より得ることができる。

抗体の精製は、塩析法、ゲルfiltration法、イオン交換クロマト法またはアフィニティーコロマト法等の公知の精製手段を用いて行なうことができる。

また、ヒト抗体は石田らが開発した方法 (PNAS, 97:722, 2000) を用いて作製できる。すなわち、まず、Trans-chromosome (Tc) マウスは石田らの方法に従い、ヒト2番染色体断片 (Ig軽鎖κ) と14番染色体断片 (Ig重鎖) をミクロセル融合法によりマウスES細胞に導入し、Joynerらの方法 (ジーンターゲティング、実験法シリーズ、メディカル・サイエンス・インターナショナル) にしたがい、それぞれの染色体断片を有するキメラマウスを作製する。次に、作製した2種類のキメラマウスを交配することによりヒト2番染色体断片 (Ig軽鎖κ) と14番染色体断片 (Ig重鎖) の両者を有するキメラマウスを作製する。マウス由来の内因性のマウス抗体の産生を失わせる為、Capuccchiらの方法 (Mol. Cell. Biol. 12:2919-2923, 1992) に従い内因性のIg重鎖とκ鎖をノックアウトしたダブルKOマウスを作製し、ヒト染色体断片を導入したキメラマウスと交配させ、ヒト2番染色体断片 (Ig軽鎖κ) と14番染色体断片 (Ig重鎖) を含み、内因性のIg重鎖とκ鎖をノックアウトしたトランスクロモソームマウスを作製する。作製したTcマウスは血中にヒト由来の抗体を産生し、一部マウスγ鎖を有する抗体も存在するが、マウスIg(κ)は検出されない。得られたTcマウスは数代経っても染色体は維持され、その子孫を以下の抗CD14ヒトモノクローナル抗体の作製に使用できる。

Tcマウスに精製したCD14抗原50μgを、タイターマックスゴールド（Titer Max Gold, CytRx社）と混合後、皮下に投与し、3週間後同様に追加投与を行う。抗体価の上昇は、抗原を固相化したプレートに希釈した抗血清を反応させ、続いて抗ヒトIgG抗体を用いて結合した血清中のヒト抗体を検出する。細胞融合は、抗体価の上昇したマウスの腹腔に抗原を50μg投与し、3日後に行う。具体的には、採取した脾細胞をマウスミエローマ細胞（SP2/O-Ag14）と混合後、PEG4000（Merck）により融合し、G418（1mg/mL）を含むHAT培地によりハイブリドーマを選択する。出現したハイブリドーマを抗ヒトIgG κ 抗体、抗IgG抗体、抗IgG2抗体、抗IgG3抗体または抗IgG4抗体を2次抗体としてスクリーニングし、CD14と結合するヒト抗体を産生するハイブリドーマを選択する。さらに後述する本発明の第十二の態様のスクリーニング方法により、本発明のヒトCD14抗体を得ることができる。

また、CDRグラフト法によるヒト化抗体はNature, 321:522, 1986に記載の方法を用いて作製できる。またヒト化抗体はヒト遺伝子を一部導入したマウスを用いてJ. Immunol. Methods 231:11, 1999に記載の方法を用いて、ファージ提示法による抗体はAnnu Rev. Immunol, 12:433, 1994を用いて、Diabody, Tribody及びTetrabodyはScFvの2、3及び4量体を用いて、それぞれFEBS Letter 454:90, 1999, Protein Eng. 10:423, 19

97及びF E B S Letter 453:164、1999に記載の方法を用いて作製できる。

本発明の抗体の断片であるFab、Fab'、(Fab')₂等も公知の方法（石川栄治、超高感度酵素免疫測定法、学会出版センター）で作製できる。

抗体を產生させる方法として、植物で產生する方法（Nature 342:76、1989）、CHO細胞、マウスミエローマ細胞（S0）等の哺乳細胞で產生する方法（Biotechnology 36:35、1994）、ミルク中への產生させる方法（Nat. Biotechnol 17:456、1999）及び大腸菌で產生させる方法（Science 240:1038、1988）等が挙げられる。

ポリペプチドは、ヒト血清中の可溶型CD14を公知の方法により精製して調製することができる。また、一般的に使用されるペプチド合成機（ペプチドシンセサイザー432A型、パーキンエルマージャパン）等を用いた方法、遺伝子組換え法（東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社）等が挙げられる。

例えば、269番から315番までの領域の連続した6個以上のアミノ酸からなるペプチドは432A型ペプチド合成機を用いてFmoc法により合成でき、TFAによる脱保護、樹脂からの切断の後、C18 HPLCカラム（Capcell-pak、資生堂）を用いて精製し、目的のペプチドを調製することができる。

本発明の抗体の好適な例として、ラットにヒト血清中より精製したCD14蛋白質を抗原として免疫した免疫細胞とミエローマ細胞を細胞融合して取得したハイブリドーマF1024-1-3が產生するF1024-1-3抗体が挙げられ

る。ハイブリドーマF1024-1-3は平成12年9月29日付けで日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所（以下、生命工学工業技術研究所という）に寄託し（受託番号P-18061）、さらに平成13年3月16日付で原寄託から国際寄託に移管した（受託番号FERM BP-7511）した。

本発明の抗体は、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する、すなわちCD14とTLRとの結合阻害剤である。このことにより、ヒトCD14を介する細胞活性化を抑制するという機能を有するので、細菌の感染と関連する疾患の治療または予防に用いることができる。例えば、敗血症などの疾患に伴う炎症性サイトカイン、特に血中のTNF濃度の上昇に伴う症状の治療または予防に有用であり、より具体的には発熱、低血圧、白血球減少症、血小板減少症、ショック及び多臓器不全などの症状の治療または予防に有用である。また、本発明の抗体が抑制する細胞活性化の原因物質はLPSのみとは限定されない。例えば、LTA、PGN若しくはマイコプラズマ等と複合体を形成したCD14の細胞活性化を抑制する。すなわち、これらを原因とする疾患においても、上記に記載のとおり、治療または予防に有用である。

本発明の抗体は、ヒトCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識するという機能を有するので、ヒトCD14を定性若しくは定量するツールとして有用である。例えば、検体と本発明の抗体を接触させ、抗原抗体複合体を形成させた後、該複合体を検出または定量する測定方法である。検体は血清、尿、体液または培養上清等が例示される。抗原抗体複合体の検出または定量法はELISA法またはRIA法等が例示される。

本発明の第二の態様は、本発明のモノクロナール抗体を產生するハイブリドーマである。本発明のハイブリドーマは本発明の第一の態様に記載した方法により作製することができる。

本発明のハイブリドーマの好ましい例は、本発明の抗体の好ましい例である F 1 0 2 4 – 1 – 3 抗体を產生するハイブリドーマ F 1 0 2 4 – 1 – 3 (受託番号 P – 1 8 0 6 1) である。

本発明の第三の態様は、配列番号 1 に記載のヒト CD 1 4 の 2 6 9 番から 3 1 5 番までの領域のアミノ酸を連續 8 個以上含むペプチドである。好ましくは 2 8 5 番から 3 0 7 番までの領域のアミノ酸を連續 8 個以上含むペプチドである。また、好ましくは連續 1 0 個以上、特に好ましくは連續 1 5 個以上のアミノ酸からなるペプチドである。

本発明のペプチドは本発明の第一の態様に記載した方法により作製することができる。

本発明の第四の態様は、本発明の第三の態様のペプチドを免疫原として用いることを特徴とする抗体の作成方法である。免疫原として用いるペプチドの好ましい例は、本発明の第三の態様の好ましいペプチドの例である。

本発明の方法の詳細は、本発明の第一の態様に記載したとおりである。

ただし、ペプチドは分子量が小さいため、通常免疫原性を持たない。したがつて、ペプチドのアミノ酸に含まれる側鎖の官能基を利用してキャリアーと結合させて、免疫原とする。キャリアーとしては牛血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) 、サイログロブリンまたはアボアルブミン等が用いられる。

本発明の方法により作成された抗体がCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有することが好ましい。

本発明の第五の態様は、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有し、以下①または②のいずれかであるCD14改変体ポリペプチドである。

①配列番号1に記載のアミノ酸配列のN末端が1～6番目のいずれかであり、C末端が246～306番目のいずれかのアミノ酸配列を有する、

②配列番号1に記載のアミノ酸配列のN末端が1～6番目のいずれかであり、C末端が269～356番目のいずれかであり、かつ269～307番目のアミノ酸のいずれか一つ以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する。

以下には、ヒトCD14ポリペプチドのアミノ酸配列を主として説明し、ヒトCD14のアミノ酸配列を単にCD14のアミノ酸配列と称することもあるが、ヒト以外の哺乳動物のCD14であってヒトCD14の269番目から307番目のアミノ酸に相当する機能を有する部位が同様に改変され、本発明の改変体と同等の効果を示す範囲であれば、CD14はヒト以外の種のCD14ポリペプチドであってもよい。

「CD14改変体ポリペプチド」とは、CD14ポリペプチドの一部が欠失したポリペプチド、CD14ポリペプチドのアミノ酸の一部が置換したポリペプチド及びCD14ポリペプチドにアミノ酸を付加したポリペプチドが含まれる。また、これらの改変が組み合わさった改変体ポリペプチドも含まれる。

本発明のポリペプチドはCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する。CD14とTLRとの結合を阻害する機能についての詳細は、本発明の第一の態様に記載したとおりである。

また、本発明のポリペプチドは、T L R 発現細胞の細胞活性化を30%以上抑制するポリペプチドが好ましい。

より具体的なアッセイ系においては、ポリペプチドの濃度が $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ 以下で、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ のL P S、 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ の外因性のCD 1 4 存在下でのT L R 発現細胞のN F - κ B の活性化若しくはI L - 8 産生を30%以上抑制するポリペプチドが好ましい。より好ましくは、40%以上抑制するポリペプチドである。特に好ましくは50%以上抑制するポリペプチドである。さらに好ましくは50%以上抑制するポリペプチドである。特に好ましくは70%以上抑制するポリペプチドである。

また、本発明のCD 1 4 改変体ポリペプチドは、該ポリペプチド自身ではL P S 存在下で内皮細胞のサイトカインを誘導しないポリペプチドが好ましい。より具体的なアッセイ系においては、このポリペプチドの濃度が $300\text{ ng}/\text{m}\text{l}$ 以下で、 $10\text{ ng}/\text{m}\text{l}$ のL P S 存在下での内皮細胞のI L - 6 産生を誘導しないポリペプチドが好ましい。

「誘導しない」とは、そのアッセイ系において、測定されるI L - 6 が検出限界以下であることである。たとえば、I L - 6 産生の測定において、h u m a n I L - 6 E I A k i t (P E B i o s y s t e m s 社) を使用する場合は、検出限界以下とは $50\text{ pg}/\text{m}\text{l}$ 以下である。

また、本発明のCD 1 4 改変体ポリペプチドは、外因性のL P S / CD 1 4 による内皮細胞のサイトカインの産生を60%以下に抑制するポリペプチドが好ましい。

より具体的なアッセイ系においては、ポリペプチドの濃度が $300\text{ ng}/\text{m}\text{l}$ 以上で、 $10\text{ ng}/\text{m}\text{l}$ のL P S、 $300\text{ ng}/\text{m}\text{l}$ の外因性のCD 1 4 存在下

での内皮細胞のIL-6産生を60%以下に抑制するポリペプチドが好ましい。

より好ましくは、40%以下に抑制するポリペプチドである。

「LPS/CD14」とは、LPSとCD14とが結合した複合体である。

この活性の点においては、前記①のポリペプチドのうちでも、C末端が246番目～285番目のいずれかであるCD14改変体ポリペプチドが好ましい。後述する本発明のCD14低分子種は、分子量の面から、C末端が246番目～285番目のいずれかであり、本発明のCD14改変体ポリペプチドと同じ機能を有している。このことは、好ましい例であるC末端が246番目～285番目のいずれかであるCD14改変体ポリペプチドはいずれも同じ機能を有している根拠となる。さらに好ましくは、C末端が246番目または285番目であるポリペプチドである。

またこの活性の点においては、前記②のポリペプチドのうちでも、C末端が269～356番目のいずれかであり、かつ269～286番目のアミノ酸のいずれか一つ以上が、他のアミノ酸であるLeu、Ala、CysまたはGlyに置換されたCD14改変体ポリペプチドが好ましい。より好ましくは、C末端が284～356番目のいずれかであり、かつ284～286番目のアミノ酸のいずれか一つ以上が、他のアミノ酸であるLeu、Ala、CysまたはGlyに置換されたCD14改変体ポリペプチドである。さらにはC末端が307番であり、かつ284～286番目のアミノ酸のいずれか一つ以上がLeu、Ala、CysまたはGlyに置換されたCD14改変体ポリペプチドが好ましい。

また、細菌菌体成分をポリペプチド自身が除去するという面で、本発明のポリペプチドは細菌菌体成分と結合することが好ましい。例えば、LPSのCD14

の結合部位は7～14番目及び57～64番目であり、その部位の配列は本発明のポリペプチドは維持されている。

本発明のポリペプチドは機能を維持していれば、N末端のアミノ酸1～6個が欠失、置換、挿入または付加されていてもよい。例えばN末端にさらにMetが付加されたポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。また、途中のアミノ酸配列は、1または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されていてもよい。

本発明のポリペプチドは、その特徴を失わない限り、いかなる修飾を受けてもよい。修飾としては、その蛋白質が動物細胞または酵母等の真核細胞の培養により產生される過程で受ける可能性のあるポリペプチドの翻訳過程または翻訳後の修飾及び化学的修飾等がある。

これらは、例えばメチオニンや糖鎖の付加等があげられ、蛋白質に対する糖付加としては、N-グリコシレーション、O-グリコシレーションおよび非酵素的な糖付加などが知られており、本発明のポリペプチドは、何れの糖鎖を有しても有していないなくてもよい。また、糖鎖の数、長さ、または糖鎖の糖組成および配列はこれら宿主の培養時の培地組成などによっても異なるため、特に限定されない。その他の天然の修飾としては、脂質の結合等がある。

また、ポリペプチドをさらに様々に修飾することが可能である。修飾可能な部位としては、N末端もしくはC末端のアミノ酸残基または側鎖の官能基であり、例えば、ポリエチレングリコール、スチレンーマレイン酸コポリマー、デキストラン、ピランコポリマー、ポリリジン等の合成高分子、脂質、多糖類等の天然分子、ホルモン等の生理活性分子、マグネタイト等の無機物質等をポリペプチドに

結合させることができ、さらに、側鎖にはペプチドも結合させることができる（
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1487-1491,
1981）；Biochemistry, 28, 6619-6624, 1989
）。

その他にも、修飾を受けたポリペプチドとして、例えば、カルボキシル基の脂肪族エステル、アンモニアまたは一級若しくは二級アミンとの反応によるカルボキシル基のアミド、アシル残基（例えばアルカノイルまたはカルボキシルアロイル基）によって形成されるアミノ酸残基の遊離アミノ基のNーアシル誘導体、あるいはアシル残基によって形成された遊離ヒドロキシル基（例えばセリンまたはスレオニン残基のヒドロキシル基）のOーアシル誘導体が含まれる。

本発明のポリペプチドも上述のような公知の方法の組み合わせによって上述のような修飾が可能である。従って、本発明のポリペプチドには、その特徴を失わない限り、このような修飾を受けたものも含まれる。また、それらの修飾によって、本発明のポリペプチドの活性または機能を修飾または向上させたり、別の活性または機能を付与したり、組み合わせることも可能である。例えば、活性または機能としては、安定性、溶解性、体内動態または特定の細胞、組織もしくは臓器への指向性等が含まれる。そのような修飾を受けたポリペプチドも本発明の範囲に含まれる。

また、本発明のポリペプチドは、塩の形で存在するものも包含する。ここで、「塩」とは、蛋白質分子のカルボキシル基の塩およびアミノ基への酸付加塩の両者を意味するものである。カルボキシル基の塩は、無機塩、たとえばナトリウム、カルシウム、アンモニウム、三価の鉄または亜鉛の塩等、および有機塩たとえ

ばトリエタノールアミン、アルギニンもしくはリジン、ピペリジン、プロカイン等によって形成される塩を包含する。酸付加塩には、たとえば塩酸もしくは硫酸のような鉱酸との塩、および有機酸たとえば酢酸もしくはシュウ酸との塩が含まれる。

本発明のポリペプチドは医薬への応用が可能であるが、その場合には上記の修飾等は医薬的許容性を維持するものであることが望ましい。

本発明のポリペプチドは、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する、すなわちCD14とTLRとの結合阻害剤である。このことにより、ヒトCD14を介する細胞活性化を抑制するという機能を有するので、細菌の感染と関連する疾患の治療または予防に用いることができる。例えば、敗血症などの疾患に伴う炎症性サイトカイン、特に血中のTNF濃度の上昇に伴う症状の治療または予防に有用であり、より具体的には発熱、低血圧、白血球減少症、血小板減少症、ショック及び多臓器不全などの症状の治療または予防に有用である。また、本発明のポリペプチドが抑制する細胞活性化の原因物質はLPSのみとは限定されない。例えば、LTA、PGN、リポアラビノマンナン若しくはマイコプラズマ等と複合体を形成したCD14の細胞活性化を抑制する。すなわち、これらを原因とする疾患においても、上記に記載のとおり、治療または予防に有用である。

また、本発明のポリペプチドの生産方法は特に限定されず、一般的に使用される化学合成機（ペプチドシンセサイザー430A型、パーキンーエルマージャパン）などを用いて人工合成してもよく、遺伝子組換え法により得たものであってもよい。またそれ等から分離精製された前駆体ポリペプチドを適切な化学的処理、例えば酵素を用いて処理することによって、欠失または断片化させて得られるもの、及びそれらを化学的に結合させたものおよび多量体化させたものでもよい。

上記のうち、生産量、生産されたタンパク質の均一性または純度の面、例えば、ヒト由来の他の夾雜タンパク質を含まないこと等から遺伝子工学的に生産されたものであることが好ましく、その具体的な例は実施例で詳述する。

本発明の第六の態様は本発明の第五の態様のポリペプチドをコードする遺伝子である。

一般に、アミノ酸をコードする遺伝子のDNAのトリプレット（コドン）は、アミノ酸の種類によって1種類から6種類まで存在することが知られているので、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子のDNAの塩基配列は1種類には限定されない。従って、本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を含有する遺伝子である限り、いかなる塩基配列からなるものであっても、本発明の範囲内に含まれる。好ましくは、本発明の遺伝子は、本発明のポリペプチドをコードする塩基配列のうち、配列表の配列番号3の5'端は174番アデニンから始まり3'は722番チミンから1091番アデニンまでの配列からなるDNAの遺伝子、または配列表の配列番号2の5'端は174番アデニンから始まり3'は980番グアニンから1241番シトシンまでの配列からなるDNA

の遺伝子であり、978番シトシンから1094番グアニンまでの配列のアミノ酸をコードするトリプレットの一部をGCTもしくはGCG (Alaのコドン)、GGT (Glyのコドン)、CTT (Leuのコドン) またはTGT (Cysのコドン) で置換したDNAの遺伝子である。

好ましい本発明の遺伝子のDNAの塩基配列を配列番号4～6に示す。また、配列番号4～6の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有するポリペプチドをコードするDNAも本発明の遺伝子に含まれる。

ストリンジエントな条件とは、例えば、50%ホルムアルデヒド、50倍濃度の標準クエン酸溶液 (SSC)、50mMリン酸緩衝液 (pH 6.5～6.9)、40μgサケ精子DNA、4倍濃度のデンハルト溶液 (フナコシ) の溶液中で、DNAの塩基配列により求められるのTmより25℃低い温度でハイブリダイズを行うことである。その他、サムブルック J. (Sambrook J.) らの方法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク (New York), 1989年) に記載の条件も使用できる。

本発明の遺伝子はcDNA、染色体DNAおよびそれらの組合せならびに適当にスプライシングされうるイントロンを含むcDNAであってもよい。しかし、遺伝子工学的な取扱いの容易さから、本発明のDNAはcDNAであることが好ましい。

本発明によれば、本発明の新規遺伝子のDNAに対応するRNA、または本発

明の新規遺伝子のDNAと相補的な配列を含有するDNA及びRNAも提供される。本発明の新規遺伝子のDNAとそれに相補的なDNA及びRNAとが、互いに相補的に結合して2本鎖、あるいは3本鎖を形成していても良い。また本発明の新規遺伝子のDNAと雑種形成（ハイブリダイズ）しうる塩基配列を含有するDNA及びRNAも提供される。さらには該ハイブリダイズも提供される。この場合においてもそれらが互いに結合して2本鎖、あるいは3本鎖を形成していても良い。以上の場合、核酸塩基として、イノシンのようなユニバーサルベースを有していてもよい。

本発明の遺伝子は、いかなる方法で得られたものであってもよい。例えば、化学合成されたものであってもよく、適当なDNAライブラリーから得たものであっても、CD14の全長または部分をコードする遺伝子のDNAを含むDNAを鋳型としてPCR (Polymerase Chain Reaction) 法で得たものであってもよい。また、これらの方法で得た遺伝子またはその断片を必要に応じてアニーリング、ライゲーションして作製することもできる。

本発明の遺伝子のDNAは、以下のようにして化学合成をすることができる。具体的には、本発明の遺伝子のDNAを約20-30塩基からなる断片に分けて、DNA化学合成機（例えば、394型、アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、複数の断片として合成し、その後、必要に応じて各断片の5'末端をリン酸化して各断片をアニーリングし、ライゲーションして目的のDNAを得る。

また本発明の遺伝子は、ゲノムライブラリーもしくはcDNAライブラリー等を鋳型とするPCR法によっても得ることができる。PCR法を用いる場合、公

知の塩基配列および本発明のポリペプチドをコードする遺伝子のDNA等の塩基配列をもとに、また必要に応じて制限酵素認識配列等組み合わせて設計した、センスプライマー及びアンチセンスプライマーを作製し、任意のDNAライブラリー等に対して公知の方法 (Michael A.I. 等編、Polymerase Chain Reaction, PCR Protocols, a guide to methods and applications, 1990, Academic Press、参照) に準拠して行うことによって得ることができる。典型的な例は、実施例において述べる。

上述したDNAライブラリーは、本発明の遺伝子のDNAまたはその一部を含むものであればよく、特に限定されない。したがって、市販のDNAライブラリーを使用してもよく、ヒトの末梢血などから得たリンパ球、ヒトの株化細胞、またはハイブリドーマなどといった適当な細胞を、必要があれば適当な活性化剤で活性化し、サムブルック J. らの方法に準拠してcDNAを作製して使用してもよい。なお、後述する19アミノ酸からなるヒトCD14シグナル配列を有し配列表の配列番号1のN末端が1から始まりC末端が285番ロイシンのペプチド配列からなるポリペプチド、またはN末端は1から始まりC末端が307番ロイシンのペプチド配列からなるポリペプチドで、286番セリンをアラニンに置換したポリペプチドをコードするDNAを含む形質転換体は、平成12年3月14日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の生命工学工業技術研究所に寄託し（それぞれ受託番号P-17777および受託番号P-17778）、さらに平成13年3月16日付で原寄託から国際寄託に移管（それぞれ受託番号FERM BP-7479および受託番号FERM BP-7480）した。

本発明の遺伝子は、本発明の第七の態様の組換えベクターの作製に使用することができ、この組換えベクターによって宿主を形質転換させることにより、本発明のポリペプチドを均一にかつ大量に生産するために使用することができる。

これによって、本発明のポリペプチドを治療薬の主成分として医薬の分野に提供したり、診断薬として利用することが可能になる。本発明の遺伝子のDNAを用いて本発明のポリペプチドを產生する方法は、本発明の第九の態様の説明に記載する。

本発明の第七の態様は本発明の第六の態様の遺伝子を含有することを特徴とする組換えベクターである。

本発明の組換えベクターは、環状または直鎖状等、1本鎖または2本鎖ならびにその複合した鎖等、いかなる形態のものであってもよく、目的に応じて適宜選択しうるが、取り扱いの容易さや宿主中への組み込みの容易さからは、環状であることが好ましく、安定性等からは2本鎖であることが好ましい。

本発明の組換えベクターは、本発明の遺伝子のDNAの塩基配列の5'末端、あるいは3'末端のいずれか一方、もしくはその両方に任意の1つ以上の塩基が付加されたものであってもよい。

ここで付加される塩基は、本発明の遺伝子のDNAに、コーディングフレームのずれを生じさせない限りいかなるものであってもよく、例えば、アダプター配列、リンカー配列、シグナル配列をコードする塩基配列、 β -ガラクトシダーゼ等の他のポリペプチドをコードする塩基配列、もしくはDNAプローブ等を作製する際にその検出感度の増加を目的として付加される配列等を挙げることができる。

本発明の組換えベクターは、本発明の遺伝子に加えて、必要により他の塩基配列を含有していることが好ましい。ここでいう「他の塩基配列」とは、エンハンサーの配列、プロモーターの配列、リボソーム結合部位配列、DNAのコピー数の増幅を目的として使用される塩基配列、翻訳開始コドン、シグナルペプチドをコードする塩基配列、他のポリペプチドをコードする塩基配列、翻訳終止コドン、ポリA付加配列、スプライス配列、複製開始点、選択マーカーとなる遺伝子配列等をいう。

どのような塩基配列が必要となるかは、作製する組換えベクターの使用目的によって定まるが、好ましくは本発明のポリペプチドを産生するように宿主細胞を形質転換できるものであり、したがって、当該組換えベクターは少なくとも、本発明の遺伝子に加えて翻訳開始コドン、終止コドン、複製開始点および選択マーカー遺伝子の配列を含有していることが好ましく、さらに宿主内で機能するプロモーター配列を含有しているものがより好ましい。特に、これらの配列に加えて、シグナルペプチドをコードする配列を含有するものは、本発明のポリペプチドを分泌発現するように、宿主細胞を形質転換できるので好ましい。

配列表の配列番号2の5'端は174番アデニンから始まり3'端は722番チミンから1091番アデニンまでのいずれかの配列からなるDNA、または5'端は174番アデニンから始まり3'端は980番グアニンから1241番シトシンまでのいずれかの配列からなるDNAであり、978番シトシンから1094番グアニンまでの配列のアミノ酸をコードするトリプレットの一部をGCTもしくはGCG (Alaのコドン)、GGT (Glyのコドン)、CTT (Leuのコドン) またはTGT (Cysのコドン) で置換されたDNAを適當な

ベクター中でシグナルペプチドをコードするシグナル配列の下流に接続した組換えベクターを作製し、これを用いて適当な宿主を形質転換させると、ここで得られた形質転換体の培養時にはその培養上清中に配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のポリペプチドのC末端が183～306番目のいずれかであるCD14改変体ポリペプチドまたはC末端が269～356番目のいずれかであり、かつ269～307番目のアミノ酸のいずれか一つ以上が他のアミノ酸に置換されたCD14改変体ポリペプチドを分泌させることができる。接続するシグナル配列は、適宜選択することが可能であるが、ヒトCD14のMet Glu Arg Ala Ser Cys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Val His Val Ser Alaの配列のシグナルペプチドをコードするシグナル配列(Goyerら、Nuclic Acid Research、16巻、4173頁、1988年)が好ましい。

その他に、TNFまたはG-CSFのシグナルペプチド、大腸菌のアルカリリフオスファターゼのシグナルペプチド、酵母のPHO1のシグナルペプチドおよび酵母の α -ファクター(α -factor)のシグナルペプチドをコードする配列等から使用する宿主および条件に応じて適したものを選択して利用することができる。

また大腸菌を宿主として封入体として発現させる場合には、メチオニンもしくはメチオニンをN末端に含むペプチドを付加することが好ましい。

選択マーカー遺伝子としては、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子等を挙げることができ、少なくとも2つの選択マーカーが含まれている組換えベクターが、酵母や

哺乳動物細胞を宿主にする場合に、目的遺伝子で形質転換されたクローンを容易に選択できるという理由から好ましい。コピー数の増幅を目的として使用される配列としては、デヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子（d h f r）の配列等を使用することができる。

宿主内で機能するプロモーター配列としては、宿主が大腸菌の場合は t r p プロモーターまたは lac プロモーターまたは T 7 ポリメラーゼであり、宿主が酵母や COS 細胞などの真核細胞の場合はアルコールオキシダーゼ 1 (AOX 1) のプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、 SV 40 のプロモーター、 SR α のプロモーター、またはヒトエロンゲーションファクター 1 α (EF 1 α) のプロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) のプロモーターなどの配列を挙げることができる。

本発明の組換えベクターの好ましい例は、宿主の観点からすると、本発明のペリペプチドを発現するように動物細胞または酵母等の真核細胞を形質転換させるものである。従って、本発明の組換えベクターは、少なくとも、翻訳開始コドン、終止コドン、選択マーカー遺伝子に加えてポリ A 付加配列を、さらに動物細胞で機能する SV 40 のプロモーター、 EF 1 α のプロモーター、 SR α のプロモーターまたは、酵母で機能する AOX 1 のプロモーターならびに、 SV 40 の複製開始点等を有するものが本発明の組換えベクターの好適な例として挙げられる。

本発明の組換えベクターは、本発明の遺伝子の DNA を任意の塩基配列を有する他の DNA 断片とライゲーションする方法、または任意のベクターに導入する方法 (Sambrook J. 等、 Molecular Cloning, a

Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

参照) 等で得ることができる。

具体的には、DNAとベクターとをそれぞれ適当な制限酵素で消化して、得られた各断片をDNAリガーゼを用いてライゲーションさせればよい。ベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター等いかなるものでもよく、市販品を利用してもよい。ベクターの代表的なものとしては、pUC118、pBR322、pSV2-dhfr、pBluescript II、PHIL-S1、λZapII、λgt10、pAc700、YRP17、pEF-BOS、pEFN-II等が挙げられる。

また、本発明の組換えベクターは、いかなる用途に使用されるものであってもよい。例えば、本発明のポリペプチドを工業的に產生させる際に用いるものであってもよいし、本発明の新規DNAを増幅させ量産するために用いるものであってもよい。また、本発明の組換えベクターは、本発明の第四の態様の形質転換体を作製するために使用できる。

本発明の第八の態様は本発明の組換えベクターで形質転換されたことを特徴とする形質転換体である。すなわち、本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、宿主となる細胞や微生物に導入する事によって得ることができる。

本発明の形質転換体は、原核細胞、真核細胞のいずれを形質転換したものであってもよい。原核細胞としては、大腸菌、枯草菌などを挙げることができる。真核細胞としてはCOS細胞、CHO細胞、HeLa細胞、Namalwa細胞等の哺乳動物細胞の他、Sf細胞等の昆虫細胞や酵母を挙げることができる。この

うち、大腸菌、哺乳動物細胞、酵母を形質転換して得られた形質転換体は扱いや
すく、高発現量が期待できるので好ましい。

哺乳動物細胞の中では、遺伝子のコピー数を増加させることができるために、C
HO細胞のd h f r欠損株を宿主とすることが好ましい。また、酵母の中では、
外来タンパク質の分泌生産量が多いために、ピキア（P i c h i a）属の酵母や
付加糖鎖が哺乳類と類似しているS ch i z o s a c c h a r o m y c e s p
o m b eを宿主とすることが好ましい。

また、本発明の組換えベクターの機能を充分に発揮させるためには、本発明の
組換えベクターの作製に使用するベクターは、宿主細胞に適した種類のものでな
ければならない。組換えベクターに使用したベクターと宿主との好ましい組合わ
せの例としては、p U C 1 1 8と大腸菌、p E TとT 7 R N Aポリメラーゼ発現
系を持つ宿主大腸菌（M a j e r l e A. ら：P r o t a i n E x p r. P
u r i f. , 1 7 : 9 6, 1 9 9 9）、p E F - B O SとC O S細胞あるいはC
HO細胞、Y a cと酵母、A c N P VとS f細胞等（実験医学臨時増刊、遺伝子
工学ハンドブック、羊土社、1 9 9 1、参照）を挙げることができる。同様に、
組換えベクターに含まれるプロモーター、シグナルペプチドをコードする塩基配
列、マーカー遺伝子等も宿主に適したものを使用する。

また、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を得るために、当該組換
えベクター中には、適当なプロモーター等発現に必要な配列を有している必要が
ある。

本発明のポリペプチドを分泌生産する形質転換体を得るには、本発明の上記生
産に適した組換えベクターであって、本発明の遺伝子の上流にシグナルペプチド

をコードする塩基配列を含有する組換えベクターで、宿主細胞を形質転換させればよい。

宿主細胞に、本発明の組換えベクターを導入する方法としては、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、アルカリ金属法、リン酸カルシウム法、D E A E - デキストラン法、マイクロインジェクション法、ウイルス粒子を用いてインフェクションさせる方法、その他の公知方法（実験医学臨時増刊、遺伝子工学ハンドブック、羊土社、1991、参照）等から、宿主または組換えベクターに適したものを選択すればよい。リン酸カルシウム法やD E A E - デキストラン法を使用すると、哺乳動物細胞の形質転換が効率よく行われるので、宿主細胞が哺乳動物細胞である場合には、これらの方法を使用することが好ましい。

本発明の形質転換体は、好ましくは、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体がよく、特に好ましくは、該ポリペプチドを発現し、培養上清中に分泌するものがよい。このような形質転換体を使用すれば、本発明のポリペプチドを大量に生産することが容易になるからである。

本発明の形質転換体は、いかなる目的で使用するものであってもよいが、本発明のD N A または本発明の組換えD N A 分子を大量に製造する目的や、本発明のポリペプチドを工業的に製造する目的等に使用できる。

本発明の第九の態様は、本発明の形質転換体を培養する工程を含むことを特徴とする本発明のポリペプチドの製造方法である。

本発明の形質転換体の作製方法については上述した通りである。本発明の製造方法においては、本発明の形質転換体を培養し、必要に応じて遺伝子の増幅や発現誘導を行う。次いで培養混合物を回収し、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、

各種のクロマトグラフィー等の操作を適宜組み合わせて、本発明のポリペプチドの精製を行う。

「培養混合物」とは、形質転換体、形質転換体を含む培地、もしくは培養上清または細胞のライセートを意味する。本発明の製造方法において、產生された本発明のポリペプチドが細胞培養上清中に分泌される場合は、培養上清から該ポリペプチドを精製できる。一方、該ポリペプチドが形質転換体内に蓄積される場合には、リゾチーム処理、界面活性剤処理、凍結融解、加圧、超音波処理その他の方法から宿主細胞に適したものを選択して細胞を溶解または破碎した後、遠心分離、濾過等の方法により可溶性画分または不溶性画分として該ポリペプチドを回収し、精製する。

宿主細胞が大腸菌であって、本発明のポリペプチドがペリプラズムに蓄積される場合には、ウィルスキー (Willisky) 等の方法 (J. Bacteriol., 127, 595-609, 1976) を採用して該ポリペプチドを回収することができる。

形質転換体の培養は、各種の成書を参考にして、一般的な手法で行うことができる（例えば、「微生物実験法」社団法人日本生化学会編、株式会社東京化学同人、1992、参照）。

遺伝子の発現誘導を行う場合には、組み込まれたプロモーターによって適當な薬剤を選択して使用する。例えば、*t r p* プロモーターが組み込まれている場合には 3β -インドールアクリル酸を用い、MMTV プロモーターの場合にはデキサメタゾンを、またAOX1 プロモーターの場合にはメタノールをそれぞれ使用するとよい。

遺伝子の増幅方法の代表的な例としては、d h f r 欠損CHO細胞を宿主とし、d h f r を有するベクターを使用した際にメトトレキセートを用いる方法等が挙げられる。

当該製造方法で使用する形質転換体は、本発明の形質転換体であれば、限定されないが、好ましくは、COS細胞および、CHO細胞等の哺乳動物細胞もしくは酵母、もしくは大腸菌のいずれかより選択される細胞を宿主とした形質転換体であることが好ましい。

以下に、形質転換体として大腸菌、CHO細胞等の哺乳動物細胞、ピキア（Pichia）属酵母を使用した場合の培養および発現誘導の例を示す。

t r p プロモーターを有する組換えDNA分子で形質転換された大腸菌では、L-ブロース（L-Broth）で菌体を前培養し、それをM9-CAの培地に対して1/50量となるように植え込み、37℃で培養を行う。培養開始数時間後に培地のOD550値が1～4（すなわち対数増殖期）に達した時点で3β-インドールアクリル酸を終濃度10μg/mlとなるように添加し発現誘導を行う。さらに約1～2日の培養を行うことにより、目的蛋白質を含む培養混合物を得ることができる。

AOX1プロモーターを有する組換えベクターで形質転換されたピキア（Pichia）属の酵母を用いる場合には、BMGY培地で約2日間前培養し、培地交換後、メタノールを加えて発現誘導する。さらに、30℃で約1～2日の培養を行い、目的蛋白質を含む培養混合物を得ることができる。

EF1αのプロモーターを有する組換えベクターでCHO細胞等の哺乳動物細胞を形質転換して得られた形質転換体は、10%ウシ胎児血清を含有するDME

M培地で培養する。細胞は、約 $1 \sim 10 \times 10^4$ 細胞/m²の濃度で植え込み、37℃、5%炭酸ガス/95%空気の条件で培養を行う。通常、2~3日後にコンフルエントな状態になるので、その時点で培地を、血清不含のD-MEMに交換する。さらに引き続き、2~3日間の培養を行うことにより目的蛋白質を含む培養混合物を得ることができる。なお、目的蛋白質の產生量が少ない場合には前述したようにメトトレキセートにより遺伝子を増幅し、產生量を増加させることも可能である。

上述の培養混合物から本発明のポリペプチドを精製する方法としては、通常ポリペプチドの精製に使用されている方法のなかから適当な方法を適宜選択して行う。具体的には、塩析法、限外濾過法、等電点沈澱法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーや抗体クロマトグラフィー等の各種アフィニティーコロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィー等、通常使用される方法の中から適切な方法を適宜選択し組み合わせ、必要によりHPLCシステム等を用いて精製を行えば良い。

当該製造方法において、本発明のポリペプチドは、大腸菌のβ-ガラクトシダーゼや、他のポリペプチドとの融合蛋白質として発現させてもよいが、この場合には、精製工程のいずれかのステップにおいて、融合蛋白質をプロムシアンまたはヒドロキシリルアミン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理して当該蛋白質を切り出す操作が必要になる。

また、使用する形質転換体が大腸菌であった場合に、当該蛋白質を不溶化蛋白質であるインクルージョンボディーとして産生させた場合には、精製の際に、イ

ンクルージョンボディーを可溶化し、デネイチャーし、リフォールディングするという操作を精製の適当なステップで行えばよい (Thomas E等, J. M
olecular Biology, 87, 563-577, 1974)。

具体的には、まず、菌体を破碎し、遠心分離してペレットを回収する。次に、尿素もしくはグアニジン塩酸、界面活性剤、還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンを適量含む可溶化バッファー（たとえば、5Mグアニジン塩酸、0.005%Tween 80、50mMトリス塩酸(pH 8.0)、5mM EDTA、2mM還元型グルタチオン、0.02mM酸化型グルタチオンを含む緩衝液）をペレットに加え、2-メルカプトエタノールを加えてデネイチャーし、上記可溶化バッファーからグアニジン塩酸を取り除いた溶液に対して透析してリフォールディングする。融合蛋白質として発現させている場合には、これらの操作の後で、プロムシアン等の化学物質もしくはプロテアーゼ等の酵素で不要な蛋白質部分を切断し、その後、適当なクロマトグラフィーを行う。

当該製造方法によれば、本発明のポリペプチドを均一にかつ高効率で工業的に大量生産することができる。

本発明の第十の態様は、血漿から得られる分子量 36 ± 5 kDa の CD14 低分子種である。

本発明の CD14 低分子種は分子量が約 36 ± 5 kDa である。

本発明の CD14 低分子種は血漿から得られる。「血漿から得られる」とは、実際に血漿から得ることが可能な分子のことであり、実際の作成法は限定されない。血漿から得ることが可能な分子である限り、例えば、実際に血漿から得られた分子、血漿以外から得られた分子または遺伝子組み替えにより得た分子も

含まれる。例えば、尿若しくはミルク等の体液から得られた分子も含まれる。

本発明のCD14低分子種は以下のように実質的に精製できる。

アミノ末端を認識する抗CD14抗体を用いて可溶型CD14全分子種ポリペプチドをアフィニティーコロマトグラフィー法を用いて結合し、溶出することにより血中の可溶型CD14全分子種ポリペプチドを得る。次に、可溶型CD14全分子種の内の高分子種のみと結合することが確認されている抗CD14抗体を用いて血中の可溶型CD14高分子種ポリペプチドのみを吸収除去することにより、CD14低分子種を実質的に精製することができる。

アミノ末端を認識する抗CD14抗体は、例えば、3C10、MEM-18抗体が挙げられる。また、高分子種のみと結合することが確認されている抗CD14抗体は、F1024-1-3、F1033-3-1、F1025-3-1抗体が挙げられる。F1033-3-1及びF1025-3-1抗体を産生する形質転換体は、平成11年2月9日付け及び平成11年3月30日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の生命工学工業技術研究所に寄託し（それぞれ受託番号P-17209及び受託番号P-17350）、さらに平成12年9月11日付で原寄託から国際寄託に移管（それぞれ受託番号FERM-BP-7295及び受託番号FERM-BP-7296）した。

また、CD14全分子種から通常ポリペプチドの精製に使用されている方法のなかから適当な方法を適宜選択して行うことも可能である。具体的には、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、他のアフィニティーコロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラ

フィー等、通常使用される方法の中から適切な方法を適宜選択し組み合わせ、必要によりHPLCシステム等を用いて精製を行うこともできる。

本発明のCD14低分子種は、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する、すなわちCD14とTLRとの結合阻害剤である。このことにより、ヒトCD14を介する細胞活性化を抑制するという機能を有するので、細菌の感染と関連する疾患の治療または予防に用いることができる。例えば、敗血症などの疾患に伴う炎症性サイトカイン、特に血中のTNF濃度の上昇に伴う症状の治療または予防に有用であり、より具体的には発熱、低血圧、白血球減少症、血小板減少症、ショック及び多臓器不全などの症状の治療または予防に有用である。また、本発明のポリペプチドが抑制する細胞活性化の原因物質はLPSのみとは限られない。例えば、LTA、PGN若しくはマイコプラズマ等と複合体を形成したCD14の細胞活性化を抑制する。すなわち、これらを原因とする疾患においても、上記に記載のとおり、治療または予防に有用である。

本発明のCD14低分子種は上記精製法からもわかるように、CD14のアミノ酸配列の一部を有する。すなわち、本発明の第五の態様のポリペプチドのアミノ酸配列と一致した部分を有する。

また、分子量はsCD(1-285)とsCD(1-246)の分子量の間にある。このことより、CD14低分子種はCD14のN末端は1~6付近であり、C末端は246~285付近の間である。

本発明のCD14低分子種は、CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する。さらに該CD14自身では、LPS存在下で内皮細胞のサイトカインを誘導せず、外因性のLPS/CD14による内皮細胞のサイトカインの産生を抑制

する。

本発明の第十一の態様は、抗体、抗体断片、ポリペプチドまたはCD14低分子種を含むCD14とTLRとの結合阻害剤である。

本発明のCD14とTLRとの結合阻害剤は、CD14とTLRとの結合を阻害する抗体、ポリペプチドまたはCD14低分子種のいずれかを含む。

本発明のCD14とTLRとの結合阻害剤は、CD14が直接TLRに結合することを阻害する剤、若しくはCD14が第三物質を介してTLRに結合し複合体等を形成すること等を阻害する剤であれば特に限定されない。また、その阻害機構も限定されない。

本発明の医薬組成物に含まれるCD14とTLRとの結合阻害剤はその阻害する能力として、TLR発現細胞の細胞活性化を30%以上抑制する阻害剤が好ましい。より具体的なアッセイ系においては、阻害剤の濃度が10 μ g/ml以下で、1 μ g/mlのLPS、0.5 μ g/mlの外因性のCD14存在下でのTLR発現細胞のNF- κ Bの活性化若しくはIL-8産生を30%以上抑制する阻害剤が好ましい。より好ましくは、40%以上抑制する阻害剤である。さらに好ましくは50%以上抑制する阻害剤である。特に好ましくは70%以上抑制する阻害剤である。

具体的な本発明のCD14とTLRとの結合阻害剤の例として、本発明の第一の態様の抗体、抗体断片、本発明の第五の態様のポリペプチドまたは本発明の第十の態様のCD14低分子種が挙げられる。

本発明のCD14とTLRとの結合阻害剤はCD14とTLRとの結合を阻害することにより、CD14からTLRへのシグナル伝達が阻害されるため、TL

R以降のシグナル伝達が遮断され、細胞活性化を抑制し、敗血症の治療効果を示す。

すなわち、本発明のCD14とTLRとの結合阻害剤は、細菌の感染と関連する疾患の治療または予防に有用である。例えば、敗血症、関節リウマチ、AIDS、自己免疫疾患、溶血性貧血、腫瘍、アトピー性疾患、アレルギー疾患、サルコイドーシス、マラリア、乾癬、発熱、低血圧、虚血性心疾患、白血球減少症、血小板減少症、ショック及び多臓器不全などに有用である。特に、これらの疾患に伴う炎症性サイトカイン、特に血中のTNF濃度の上昇に伴う症状の治療または予防に有用である。これらの疾患の中でも、LPSが関与するグラム陰性細菌感染、LTA若しくはペプチドグリカン等が関与するグラム陽性細菌感染、またはマイコプラズマに伴う敗血症の治療または予防に有用である。すなわち、これらの疾患の症状が表れたとき若しくは進行したときの治療効果のみならず、血中にLPS、LTA若しくはマイコプラズマ等が高値である患者またはそのような状況に置かれることが予想される細菌感染者に予防効果に有用である。

本発明の第十二の態様は、遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞に、CD14及び被検物質を接触させる工程を含む敗血症用治療薬のスクリーニング方法である。

敗血症用治療薬のスクリーニング方法とは、被検物質が敗血症用治療薬若しくは敗血症用治療薬候補物質であるか否かを検討する方法である。また、複数の被検物質から敗血症用治療薬若しくは敗血症用治療薬候補物質を選択する方法である。

本発明のスクリーニング方法は、遺伝子組換え法により作成されたTLRを発

現する細胞に、CD14及び被検物質を接触させ、特定の指標の変化を検出して被検物質が敗血症の治療薬の候補となり得るか否かを判定する工程を含む。

本発明のスクリーニング方法のCD14源としては、細胞に発現しているCD14、血中等に存在するsCD14、または遺伝子組換え法により作成されるsCD14が挙げられる。細胞に発現しているCD14は、遺伝子組換え法により細胞に発現させてもよい。またsCD14は、少なくともヒトCD14の269番から315番を含むsCD14であれば、改変体であってもよい。CD14の立体構造の維持の点で、好ましくはCD14全長である。

遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞は、遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞である限り、特に限定されない。TLR源としては、先行技術に記載のクローニングされたTLRを遺伝子組換え法に用いることができる。好ましくは、TLR2、TLR4である。

またTLRを発現する細胞にCD14源があってもよい。

また、遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞に、CD14及び被検物質を接触させる工程において、同時にCD14活性化物質も接触させることが好ましい。CD14活性化物質により、活性化されたCD14がTLRに結合しやすいからである。

CD14活性化物質は、CD14と結合することにより、複合体を形成し、CD14を活性化する機能を有する物質であれば特に限定されない。例えばLPS若しくはLTA等の菌体成分、マイコプラズマ等が挙げられる。

遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞に、CD14及び被検物質を接触させる工程は、これらが接触される工程であれば特に限定されない。

例えば溶液中において直接接触させる、CD14若しくは遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞をプレート等に固定して、他を溶液中に混合しプレートに添加する、またはCD14若しくはTLRを発現する細胞の培養液中に他を添加する等が挙げられる。

遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞に、CD14及び被検物質を接触させる順番も特に限定されない。例えばこれらを同時に接触させる、CD14活性化物質およびCD14を先に接触させる、CD14活性化物質およびCD14を遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞と接触させる前に、CD14活性化物質およびCD14と被検物質を接触させる等の順番が挙げられる。

また、本発明のスクリーニング方法は、そのスクリーニング方法を阻害しない限り、他の工程を加えることができる。また加える工程の順番も特に限定されない。

例えば、動物由来の血清を接触させる工程が含まれる。動物由来の血清とは動物であれば限定されない。ヒトを含む哺乳類が好ましく例示される。さらに、ヒト、げっ歯類、ウサギ、ウシ等が好ましい。CD14とTLRとの結合には、直接的な結合、他の因子を介する結合または他の因子により活性化される結合が挙げられ、これらの血清存在下で、活性化されるCD14とTLRとの結合があるからである。

動物由来の血清を接触させる工程の順番は特に限定されない。他の工程と同時に行う、TLRと事前に接触させる等が挙げられる。

被検物質は特に限定されない。例えば、抗CD14抗体等の抗体、CD14改

変ポリペプチド等のポリペプチド、低分子化合物等が例示される。

本発明のスクリーニング方法により、簡便に敗血症用治療薬が選択できる。すなわち、本発明のスクリーニング方法は、簡便に、敗血症用医薬組成物の有効成分をスクリーニングする方法として有用である。

以下に具体的なスクリーニング方法を例示する。

(1) HEK 293 細胞等に遺伝子組み換え法により恒常にTLRを発現させ、一定量のLPSと可溶型CD14(1-356)を添加し、さらに被検物質を添加する。一定時間培養し、培養上清中に產生されるサイトカイン量を測定することにより、被検物質を判定し、スクリーニングする。また、サイトカイン量を測定する代わりに、細胞内のNF- κ Bの活性化をレポータージーンアッセイ等により測定する方法でもよい。

(2) CD14と遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞の結合をELISA法または表面プラズモン共鳴法を利用した相互作用検出装置により直接検出する方法でもよい。例えばBIACORE(ピアコア社)等の装置が挙げられる。

具体的には、CD14をプレートまたはBIACORE装置のチップ上に固相化し、そこにLPS、遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞及び被検物質を添加する。遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞のCD14への結合量を、ELISA法では標識抗体等を用いて測定するまたはBIACORE等の装置では直接測定することにより、被検物質を判定し、スクリーニングする。

TLRは膜蛋白である。その機能を解析する手段として細胞外領域を遺伝子工

学的に作製し研究に使用する方法も考えられるが、細胞外領域のみで活性が維持されるのかについては検討が必要となる。このため、全長で膜上に発現させることが可能な細胞を利用する本発明のスクリーニング方法はその問題を回避できる点で優れている。

被検物質が敗血症用治療薬であるか否かの判定は、特に限定されない。例えば、CD14とTLRとの結合を直接観察し、被検物質が結合を阻害していれば、若しくはその結合阻害の程度に応じて、敗血症用治療薬であると判定若しくは選択する、またはCD14若しくはTLRを発現する細胞の活性化を測定することにより判定若しくは選択する等が挙げられる。

例えば、上記(1)の系においては、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLPS、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のCD14(1-356)存在下でのTLR発現細胞のNF- κ Bの活性化若しくはIL-8産生を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で、30%以上抑制する被検物質を敗血症用治療薬であると判定する。

本発明のスクリーニング方法で敗血症用治療薬と判定されうる物質の例を示す。

ポリペプチドとしては、CD14の269番目から315番目のアミノ酸を一部若しくは全部を改変したCD14改変体、若しくはその改変部分を含むCD14改変体の一部を含むペプチドがその例である。これらは、競合阻害等により、CD14のTLRへの結合を阻害することにより、敗血症用治療薬となる。

CD14の改変体(N末欠失体、C末欠失体、N末及びC末欠失体、中間欠失体、アミノ酸置換体、アミノ酸付加体、アミノ酸修飾体若しくはこれらを複合した改変体等、CD14の一部を改変したペプチド)のプラスミドを遺伝子操作法

(東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社)により作製し、定法を用いてCOS-1細胞へトランスフェクションしCD14改変体を発現させることにより、入手することができる。

抗体としては、sCD14(269-315)を認識する抗体、sCD14(1-269)は認識しない抗体等が挙げられる。これらは本発明の抗体の作成方法により入手することができる。

また、下記に記載の通り、予めペプチドをドラッグデザインすることもできる。

低分子化合物を被検物質として本発明のスクリーニングを行うことにより、敗血症治療薬を選択することができる。

ただし、被検物質は特に限定されない。ランダムにもたらされた被検物質を用いてもよい。例えば下記に記載のように予めドラッグデザインすることが、スクリーニングの効率には好ましい。

CD14とTLRとの結合様式または本発明のポリペプチド若しくは本発明の抗体のCD14とTLRとの結合阻害様式を、立体的な相互作用情報として求め、ドラッグデザインを実施することができる。

立体的な相互作用情報は、CD14とTLRとの共結晶、本発明のポリペプチドとCD14若しくはTLRとの共結晶、または本発明の抗体とCD14との共結晶のX線構造解析若しくは放射光構造解析により求めることができる。その他にはNMR、電子顕微鏡、コンピューターシミュレーション等の手法により求めることができる。

立体的な相互作用情報から、ドラッグデザインを実施する例を下記に記載

する。

立体的な相互作用情報から、CD14とTLRとが相互作用することが判明したペプチド領域は、そのペプチド領域自体がアンタゴニストやアゴニストとなりうる。さらに、ファージディスプレイ、コンビナトリアル合成などの手法を用いて、活性を増強したペプチドを探索することができる。また、結晶構造からペプチドの活性コンフォメーションを推測することによって、ペプチドミミック的な合成を実施し、低分子化させることができる。

(また結合部位の構造を利用して、CD14若しくはTLRのタンパク質の形状若しくは性状に合致する化合物をコンピュータ上で、例えばDOCK (University of California, San Francisco, CA)、FlexX (Tripos, Inc. St. Louis, MO) 等のソフトウェアを使用して、スクリーニングすることができる。

(さらに、必要な活性残基の配置を利用し、立体的ファーマコフォアを予測することも可能である。このファーマコフォアを検索式として、既存のAvailable Chemicals Directory (ACD) (MDL information systems, Inc., San Leandro, CA) などの化合物データベースをCatalyst (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA)、Unity (Tripos, Inc. St. Louis, MO) 等のソフトウェアを使用して検索することで、低分子化合物のアゴニスト、アンタゴニスト候補のフォーカスドライブを設計可能であり、効率よく薬理作用を発揮しうる化合物を探索することができる。

その他の例として、相互作用領域に対して、例えば、Ludi (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA)、LeapFrog (Tripos, Inc. St. Louis, MO) 等のソフトウェアを使用して、化合物をde novo設計していくことも可能である。

さらに上記のドラッグデザイン等により得られ、本発明のスクリーニング方法により、敗血症用治療薬若しくは敗血症用治療薬候補物質であると判定された複数の化合物、本発明のポリペプチド若しくは本発明の抗体に共通する特徴を3次元的に取得することにより、CD14とTLRとの結合を阻害する作用を有する物質の立体的ファーマコフォアを得ることができる。

共通する特徴を3次元的に取得する方法としては、例えば、Catalyst 等のソフトウェアにより行うことができる

また、このようにして得られた阻害活性を有する化合物と、CD14、TLR、若しくはその両方との共結晶構造の解析をすることにより、ドラッグデザインをより精密に行うこともできる。

また本発明の抗体のCDRは、それ自体をミックすることで、低分子化することも可能であり、中和抗体同様の機能を有する化合物をドラッグデザインすることもできる。

このように探索して得られる化合物は、ポリペプチドまたは低分子化合物等に限定されない。経口吸収性などの利点を有することでは、低分子化合物が有用であると考えられる。

スクリーニングされた低分子化合物は、敗血症治療薬として有用である。また

、本記載により、低分子化合物のCD14とTLRとの結合阻害剤のスクリーニング方法が示される。

低分子化合物のCD14とTLRとの結合阻害剤の分子量は特に限定されない。低分子化合物には一般に分子量約100の化合物から、抗生物質等のように分子量約10、000の化合物も含まれる。

また本発明は、配列番号1に記載のヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用する物質のスクリーニング方法も開示する。

(ヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用する物質のスクリーニングとは、被検物質がヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用するか否かを検討する方法である。また、複数の被検物質からヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用する物質を選択する方法である。

本発明のスクリーニング方法は下記の工程1及び2を含む。

工程1. ヒトCD14の269番から315番までの領域のアミノ酸を6以上含むポリペプチドと被検物質を接触させる。

工程2. 被検物質がヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用するか判定する。

ヒトCD14の269番から315番までの領域のアミノ酸を6以上含むポリペプチドは、ヒトCD14の269番から315番までの領域のアミノ酸を6以上含めば特に限定されない。例えば、本発明のペプチドが挙げられる。また、該領域以外のアミノ酸配列を含んでいてもよい。これは該領域以外のアミノ酸配列のみからなるポリペプチドを用いて、該領域以外のアミノ酸配列に相互作用する

か否かをさらに確認すればよいからである。

該ポリペプチドと被検物質を接触させる工程は、これらが接触される工程であれば特に限定されない。例えば、溶液中に両物質を添加することにより接触させる、または該ポリペプチドをプレート等に固定して、被検物質をプレートに添加する等が挙げられる。

被検物質がヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用するか判定する工程は、該物質がヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用するか判定できる工程であれば特に限定されない。例えば、該ポリペプチドと被検物質の結合を測定することにより判定する等が挙げられる。

本発明のスクリーニング方法により、簡便にヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用する物質が選択できる。ヒトCD14の269番から315番までの領域は、本発明の第一の態様に記載した通り、本発明の抗体が認識する領域であり、CD14の他の蛋白質と相互作用可能な領域であり、該領域と相互作用する物質はCD14と他の蛋白質との相互作用を調節する物質と成ることができる。例えば、他の蛋白質がTLRである場合、該領域と相互作用する物質はCD14とTLRの相互作用若しくは結合を阻害する。このようにCD14の機能を調節する物質は敗血症用医薬組成物の有効成分として有用である。すなわち、本発明のスクリーニング方法は、簡便に、敗血症用医薬組成物の有効成分をスクリーニングする方法として有用である。

以下に具体的なスクリーニング方法の例示を示す。

(1) 抗体のスクリーニング

CD14の269番目から315番目までの領域に相互作用する、すなわち該

領域を認識する抗体のスクリーニング方法を記載する。

方法①：まず、sCD14（1-356）をプレートに固相化し、被検抗体を含む培養上清等の液体と、269-315番目の47アミノ酸より調製した合成ペプチドを混合し、添加する。269-315番目の領域を認識する抗体は、合成ペプチドにより固相のsCD14（1-356）との結合が阻害されるので、ヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用すると判定する。

方法②：CD14の269-315番目の配列を持つ合成ペプチドをプレートに固相化し、被検抗体を含む培養上清等の液体を添加する。269-315番目の領域を認識する抗体は、合成ペプチドに結合するので、ヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用すると判定する。

方法③：CD14の1-268番目の配列を持つ合成ペプチドとCD14の1-315番目の配列を持つ合成ペプチドをそれぞれプレートに固相化し、被検抗体を含む培養上清等の液体を添加する。269-315番目の領域を認識する抗体は、1-268番目の配列を持つ合成ペプチドとは結合せず、1-315番目の配列を持つ合成ペプチドと結合するので、ヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用すると判定する。

また、上記①～③の方法等により得られた抗体は、本発明の実施例2に記載した方法等により、CD14の機能を阻害するか否かを確認することができる。

（2）低分子化合物のスクリーニング

CD14の269番目から315番目までの領域に相互作用する低分子化合物のスクリーニング方法として以下のスクリーニング方法が挙げられる。

得られる低分子化合物は、CD14のアゴニスト活性若しくはアンタゴニスト

活性を有していることが望ましい。

方法①： BIACORE 2000（ピアコア社）のチップ上に sCD14 (1-268) と sCD14 (1-315) をそれぞれ別々に固相化し、 被検低分子化合物を添加する。 CD14 (1-268) とは結合せず、 sCD14 (1-315) とは結合する検体を、 被検物質がヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用すると判定する。 このことは、 sCD14 (1-315) と結合する低分子化合物が269番目から315番目のアミノ酸の領域に強い親和性を有することを示している。

方法②： CD14の269番目から315番目までのアミノ酸を含む sCD14 (1-356) をプレートに固相化し、 被検低分子化合物を添加し反応させる。 反応終了後、 プレートを一度洗浄し、 結合しなかった低分子化合物を除去し、 次に F1024-1-3 抗体を添加し、 反応させる。 ヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用する被検物質は、 sCD14 (1-356) への F1024-1-3 の結合を阻害するので、 被検物質がヒトCD14の269番から315番までの領域に相互作用すると判定する。

本発明のスクリーニング方法で得られた物質は実施例2に記載した方法等により、 CD14の機能を阻害するか否かを確認することができる。 また、 本発明のスクリーニング方法により、 敗血症治療薬であるか否かを確認することができる。

さらに本発明は、 CD14アンタゴニスト機能またはCD14アゴニスト機能を有するCD14改変体のスクリーニング方法も開示する。

CD14アンタゴニスト機能またはCD14アゴニスト機能を有するCD14

改変体のスクリーニングとは、被検物質がCD14アンタゴニスト機能またはCD14アゴニスト機能を有するか否かを検討する方法である。

CD14はLPSと結合し、細胞にシグナル伝達し、細胞を活性化する機能を有している。現在では、ランダムに改変したCD14改変体がアゴニスト作用を有するか、アンタゴニスト作用を有するかは不明であり、本スクリーニング方法により、アンタゴニスト作用を有し、アゴニスト作用を有しない改変体またはアゴニスト作用を有し、アンタゴニスト作用を有しない改変体をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング方法は下記の工程1及び工程2を含む。

工程1. LPS、被検物質と、CD14が発現していない細胞とを接触させる。

工程2. LPS、被検物質、CD14を接触させる。

工程1.において、CD14が発現しない細胞とは、例えば内皮細胞が挙げられる。LPS、被検物質とを例えば内皮細胞と接触させ、内皮細胞からのサイトカイン産生量を測定することにより、アゴニスト作用を有無が判定できる。

工程2.において、CD14源としては、細胞に発現しているCD14、血中等に存在するsCD14、または遺伝子組換え法により作成されるsCD14が挙げられる。細胞に発現しているCD14は、遺伝子組換え法により細胞に発現させてもよい。sCD14の場合は、さらにCD14が発現していない細胞とを接触させる。工程1と同様に内皮細胞からのサイトカイン産生量を測定することにより、アンタゴニスト作用を有無が判定できる。

両方の工程において、サイトカイン産生量を測定することに限定されず、遺伝子組み替え細胞によるレポーター・アッセイによる測定でもよい。

本発明のスクリーニング方法により、工程1でアゴニスト作用を有せず、工程2でアンタゴニスト作用を有する被検物質は、CD14アンタゴニストとして敗血症治療薬若しくは敗血症治療薬の有効成分として有用である。

本発明の第十二の態様は、本発明の第十一の態様のスクリーニング方法で得られた抗CD14抗体、CD14改変体若しくは低分子化合物である。

本発明の第十二の態様の抗CD14抗体、CD14改変体若しくは低分子化合物は本発明の第十一の態様のスクリーニング方法で得られたものである。本発明の第十二の態様の抗CD14抗体、CD14改変体若しくは低分子化合物は、本発明の第十一の態様に記載の通り、敗血症治療薬としてスクリーニングされて選択されたものであり、敗血症治療薬若しくは敗血症治療薬の有効成分として有用である。

本発明の第十三の態様は、CD14とTLRとの結合阻害剤を有効成分として含む敗血症用医薬組成物である。

本発明の医薬組成物に含まれるCD14とTLRとの結合阻害剤は、CD14が直接TLRに結合することを阻害する剤、若しくはCD14が第三物質を介してTLRに結合し複合体等を形成すること等を阻害する剤であれば特に限定されない。また、その阻害機構も限定されない。

本発明の医薬組成物に含まれるCD14とTLRとの結合阻害剤は、その力価として、TLR発現細胞の細胞活性化を30%以上抑制する力価が好ましい。より具体的なアッセイ系においては、阻害剤の濃度が $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ 以下で、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ のLPS、 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$ の外因性のCD14存在下でのTLR発現細胞のNF- κ Bの活性化若しくはIL-8産生を30%以上抑制する力価が好

ましい。より好ましくは、40%以上抑制する力値である。さらに好ましくは50%以上抑制する力値である。特に好ましくは70%以上抑制する力値である。

本発明の敗血症用医薬組成物に有効成分として含まれるCD14とTLRとの結合阻害剤の分子形態は特に限定されない。抗体、抗体断片、ポリペプチド、蛋白質及び低分子化合物等が例示される。

抗体、抗体断片、ポリペプチド、蛋白質は例えば本発明の第十一の態様の結合阻害剤が例示される。また、低分子化合物は本発明の第十二の態様に記載した低分子化合物である。

ヒトCD14を介した細胞活性化による敗血症の経路において、CD14とTLRとの結合阻害剤はCD14とTLRとの結合を阻害することにより、CD14からTLRへのシグナル伝達が阻害されるため、TLR以降のシグナル伝達が遮断され、細胞活性化を抑制し、敗血症の治療効果を示す。

すなわち、本発明の医薬組成物は、細菌の感染と関連する疾患の治療または予防に有用である。例えば、敗血症、関節リウマチ、AIDS、自己免疫疾患、溶血性貧血、腫瘍、アトピー性疾患、アレルギー疾患、サルコイドーシス、マラリア、乾癬、発熱、低血圧、虚血性心疾患、白血球減少症、血小板減少症、ショック及び多臓器不全などに有用である。特に、これらの疾患に伴う炎症性サイトカイン、特に血中のTNF濃度の上昇に伴う症状の治療または予防に有用である。これらの疾患の中でも、LPSが関与するグラム陰性細菌感染、LTA若しくはペプチドグリカン等が関与するグラム陽性細菌感染、またはマイコプラズマに伴う敗血症の治療または予防に有用である。すなわち、これらの疾患の症状が表れたとき若しくは進行したときの治療効果のみならず、血中にLPS、LTA若し

くはマイコプラズマ等が高値である患者またはそのような状況に置かれることが予想される細菌感染者に予防効果に有用である。

また、CD14とTLRとの結合阻害剤を有効成分として含んでいれば、製剤学的に許容される各種添加物を含んでいてもよい。例えば、担体、賦形剤、安定剤、滑沢剤、着色剤、崩壊剤、防腐剤、等張化剤、安定化剤、分散剤、酸化防止剤、干渉剤、保存剤、懸濁化剤、乳化剤、一般的に用いられる適当な溶媒の類（滅菌水や植物油等）、さらには生理学的に許容しえる溶解補助剤などを適宜含んでいてもよい。

また、本発明の医薬組成物は、抗生物質、ステロイド、各種サイトカイン抗体若しくは抗凝固因子等を含んでいてもよい。これらは、有効成分である本発明の抗体と相加効果若しくは相乗効果を示し、より有効な医薬組成物と成ることがで

きる。

本発明の医薬組成物を薬剤として投与するときの投与量は、特に限定されないが、例えば、本発明の抗体を有効成分とするときには、0.1 mg/kg以上が好ましい。より好ましくは1~10 mg/kgの投与量である。本発明の医薬組成物を薬剤として用いるときの剤形は、坐剤、吸入剤、特に注射剤等が好適である。また種々の投与経路が可能であるが、非経口投与が好ましい。非経口投与としては例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、筋肉内投与等の注射が一般的であり、その他に直腸内投与、経皮吸収、経粘膜吸収等が挙げられる。また、投与時期若しくは回数は、患者の状態にも依存するが、予防投与、単回投与若しくは連続投与等が例示される。

なお、動物への10 mg/kg投与では、急性毒性がない。

実施例

以下に、実施例をもって本発明を一層具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は、当該分野における慣用略号に基づくものである。なお、TLR4を、TOLL4（Toll4）と記載することがある。

(実施例1)

抗ヒトCD14抗体の作製

(1) [投与抗原の調製]

精製抗ヒトCD14モノクローナル抗体3C10（ATCCより購入し、通常の方法により調製し、精製したもの）5mgを、ハイトラップNHS活性化樹脂（HiTrap NHS-activated）（アマシャムーファルマシア）のマニュアルにしたがい樹脂に結合し、3C10結合アフニティーカラムを調製した。

可溶型CD14は、ヒト血清（日本バイオテストより購入）100mLを調製したカラムに添加し、続けてリン酸緩衝液（pH7.4）（以下、PBSと記載する）にて洗浄した。

波長280nmの吸光度が低下したのを確認した後、0.1Mグリシン塩酸緩衝液（pH3.0）を用いてカラムから溶出し、ダイアフロー（グレースジャパン）を用いて濃縮した。

PBSで透析後、タンパク濃度を波長280nmの吸光度（係数：1O.D.=1mg/mL）より算出した。その結果、精製可溶型CD14約200μgを

得、SDS-PAGE分析により約55kDのバンドを確認した。

(2) [抗CD14モノクローナル抗体の調製]

Wistarラット (SLCより購入) メス8週令のフットパッドに100μgの精製可溶型CD14とフロイント完全アジュバント (Difco) とを1対1で混合したものを投与し、3週間後腸骨リンパ節を摘出し、無菌的にリンパ球を採取した。

得られたリンパ球をマウスミエローマ細胞SP2/O-Ag14 (ATCC) と5対1で混合しポリエチレングリコール1500 (Sigma) を用いて安東民衛・千葉丈／著「単クローン抗体実験操作入門」83ページ、1991年(講談社)にしたがって細胞融合を行った。融合後、細胞をヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジンを含む10%胎児血清/RPMI1640に懸濁し、96穴プレート(Nunc)に播種した。

5%CO₂、37℃の条件下で培養し、増殖してくるハイブリドーマが確認できた段階でアミノブテリンを除いた培地に交換した。

細胞融合から1週間後に培養上清をサンプリングし、精製可溶型CD14を固相化したプレートでCD14に結合する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。すなわち、精製可溶型CD14を1μg/mLでプレート (Maxisorp, Nunc) に固相化し、0.1%ウシアルブミンを含むPBSでブロッキングした。次に培養上清を添加し、37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween-20を含む0.9%生理食塩水で洗浄した。

各ウエルにペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (DAKO) を添加し、37℃で1時間反応させ、洗浄後0.02%過酸化水素を含むテトラメチ

ルベンジジン発色液を添加し、10分間反応後0.5M硫酸で反応を停止した。

プレートの吸光度を450nmの波長で測定し、吸光度が0.2以上のウエルを抗CD14抗体産生ハイブリドーマとして選択した。

選択したハイブリドーマは限界希釈法（単クローニング操作法入門、安東民衛・千葉丈／著、講談社）によりクローニングし、10日後に同様にスクリーニングを行い、抗CD14抗体産生ハイブリドーマを17クローニング得た。

次にハイブリドーマを10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640で培養した後、細胞を回収しHybridoma-SFM(Gibco)で抗体産生を行い、モノクロナル抗体を含む培養上清を得た。培養上清からろ紙で細胞を除いた後、プロテインGカラム(Prosep-G、ミリポア)で精製し、17種類の精製ヒトCD14抗体を得た。

(実施例2)

ヒトCD14抗体に対する敗血症治療薬のスクリーニング

(1) [スクリーニング系の作成]

①ヒトTLR4発現プラスミドの構築

ヒトTLR4 cDNAは翻訳領域が約2.5kbよりなるため(Genbank accession No. AF17765)、TLR4 cDNAのクローニングは5'端側1.1kbおよび3'端側2.3kbを別々に行った。

ヒトTLR4のcDNAを下記の方法にてクローニングした。ヒトTLR4ゲ

ノム配列 (GenBank : accession No. AF177765)

より、センスプライマー1（配列番号7）、センスプライマー2（配列番号8）、アンチセンスプライマー1（配列番号9）及びアンチセンスプライマー2（配列番号10）を設計した。まず、センスプライマー1とアンチセンスプライマー1を用い、human lung cDNA (CLONTECH社) を鋳型に、Pyrobest DNA Polymerase (TaKaRa社) により98℃で10秒、55℃で30秒、72℃で1分のサイクルを30回繰り返し、PCR反応を行った。また、同様にセンスプライマー2とアンチセンスプライマー2を用いて、human spleen cDNA (CLONTECH社) を鋳型にPCRを行った。得られたそれぞれ約1.1kb、約2.3kbのDNA断片をT4 polynucleotide kinase (TaKaRa社) で5'末端をリン酸化した。一方、ベクターとしてpBluescript II SK (+) (STRATGENE社) をEcoRVにて消化後、脱リン酸化を行って調製し、上記PCR産物をそれぞれligationした。その後、コンピテントセルJM109 (TaKaRa社) を用い、定法に従ってTransformationをし、TLR4 cDNAの5'側の断片を持つプラスミド(pT45F) 及び3'側のフラグメントを含むプラスミド(pT43F)を得た。次にpT45FをXhoIとEcoRIで、pT43FをEcoRIとHindIIIにてそれぞれdouble digestionし、pBluescript II SK (+) のXhoI/HindIIIサイトに挿入した(three way ligation)。JM109をtransformationすることによってヒトTLR4 cDNA全長を含むプラスミドpBTLR4を得た。pBTLR

4の挿入配列を確認したところ、ヒトTLR4 ゲノム配列のexon配列と一致した。さらにヒトTLR4を哺乳動物細胞で発現させるために、pBTLR4よりHindIIIにてヒトTLR4 cDNAを切り出し、pcDNA3.1 (-) (Invitrogen社) のHindIIIサイトに挿入した。JM109をtransformationしてヒトTLR4を哺乳動物細胞で発現させるプラスミドpcDNAT4を得た。

②ヒトTLR4発現形質転換株の樹立

ヒトTLR4発現形質転換株を樹立するために、①で作製した発現プラスミドpcDNAT4をヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293に下記の方法にてトランスフェクションした。即ち、 $25\mu l$ のFuGENE6（ロッシュ・ダイアグノスティックス社）と $6.3\mu g$ のpcDNAT4を添付プロトコールに従って混合した後に、 75cm^2 のルーフラスコにセミコンフルエントに増殖したHEK293細胞へ添加した。翌日、細胞をルーフラスコより剥離し、96well-plateに $250\text{cells}/\text{well}$ ずつ巻きなおした。さらにその翌日に終濃度 $1.2\text{mg}/\text{ml}$ のG-418を添加し、以降3~4日毎に終濃度 $1.2\text{mg}/\text{ml}$ のG-418を含む培地で培地交換を行い、20日間選択培養を行った。得られたG-418耐性クローン24株について、次にLPS/sCD14に対する応答性を調べた。24種の各クローンを24well-plateへそれぞれ $2.0 \times 10^5\text{ cells}/\text{well}$ で植え込んだ。 37°C 、5% CO₂で一昼夜培養した後、1wellあたり 50ng のpNFκB-Luc (CLONTECH社) と $1\mu l$ のFuGENE6の混合液を添加し、さらに24時間培養した。 $0.5\mu g/\text{ml}$ のsCD14 (1-356) (作製方法は実施例8

に記載)と $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSの混合物を添加して刺激を行った。6時間後に、培養上清を除去し、細胞をPBS⁻にて洗浄し、Passive lysis Buffer (Promega社) $100 \mu\text{l}/\text{well}$ にて細胞を溶解した。細胞抽出液 $20 \mu\text{l}$ 中のルシフェラーゼ活性をLuciferase Assay Substrate (Promega社) を用いて測定した。測定には1420 ARVO^{sx}マルチラベルカウンター (Wallac社) を用いた。その結果、細胞抽出液中にルシフェラーゼ活性を示すクローンHEKT4-14を得た。尚、HEK293を用いて同様の実験を行ったが、ルシフェラーゼ活性は確認できなかった。HEKT4-14でのLPS/sCD14によるルシフェラーゼ活性誘導は発現しているTLR4に依存していた(図1)。

(2) [ヒトCD14抗体に対する敗血症治療薬のスクリーニング]

HEKT4-14細胞を10%非働化FBSを含むDMEM培地に懸濁し、 1×10^5 細胞/wellで24well-plateに播き込み、5%CO₂、37°Cの条件下で24時間培養した。その後、FUGENE 6を用いて、リポータージーンpNF κ B-Luc (CLONTECH社) を $100 \text{ng}/\text{well}$ 導入し、さらに24時間培養を続けた。終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLPS (E. coli 011: B5、Difco 社)、終濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のsCD14 (1-356) さらに抗CD14抗体3C10あるいは実施例1で得られた抗CD14抗体を終濃度 $1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し、6時間培養を続けた後に、細胞をPassive Lysis Buffer (Promega社) で溶解し、Luciferase活性をLuciferase Assay Substrate (Promega社) を用いて添付のプロトコールにしたがって測定し

た。その結果、活性を有する抗体として、図2に示すように、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体添加系で、NF- κ Bの活性化を約75%阻止したF1024-1-3抗体を得た。

またF1024-1-3抗体のアイソタイプをRat MonoAB ID/SPキット(ZYMED社)を用いてタイピングしたところ、IgG1/ κ であった。

(実施例3)

F1024-1-3抗体のIL-6産生阻害活性

ヒト血管内皮細胞HUVEC(三光純薬社)を0.05%トリプシン0.53mM EDTAを含むPBS⁻で剥離後、健常ヒト血清より抗CD14抗体を用いて可溶型CD14を除去した血清を2%含むRPMI1640培地(旭テクノガラス社)(以下、2%CD14w/oHS/RPMIと表記)にて懸濁し、 5×10^4 細胞/Well($50\text{ }\mu\text{l}/\text{Well}$)で96ウェルプレートに植え込み37℃、5%CO₂の条件下で24時間培養した。

可溶型CD14を除去したヒト血清を14%含むRPMI1640培地を $10\text{ }\mu\text{l}$ 、 $120\text{ ng}/\text{ml}$ のLPS(E. coli 055:B5、Difco社) $10\text{ }\mu\text{l}$ 、 $3.6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の血清由来可溶型CD14を $10\text{ }\mu\text{l}$ 、及び $90\text{ ng}/\text{ml}$ のF1024-1-3抗体または3C10抗体 $40\text{ }\mu\text{l}$ を加えて細胞に添加した。この混合液を20時間培養を行った後、培養上清中のIL-6をヒトIL-6 EIAキット(アプライドバイオシステムズ社)で測定した。

IL-6の測定はヒトIL-6 EIAキット添付のプロトコールに従い、行った。即ち、培養上清 $100\mu l$ をIL-6抗体固相化プレートに移し、37℃で60分間インキュベーションした。その後、反応液を除去し $400\mu l/Well$ のWash Buffer 2で4回洗浄し、 $100\mu l/Well$ で抗ヒトIL-6抗体を添加し37℃、30分間インキュベーションを行った。反応液を除去、 $400\mu l/Well$ のWash Buffer 2で4回洗浄した後にペルオキシダーゼを標識したストレプトアビジン溶液を $100\mu l/Well$ 加え、さらに37℃、30分間インキュベーションを行った。

洗浄後発色基質(TMB)を $100\mu l/Well$ 添加し室温で15分間反応させた後に、停止液 $100\mu l/Well$ を加え反応を停止した。 450nm の波長の吸光度を測定し、サンプル中のIL-6の産生量を算出した。なお、コントロール抗体のラットIgGおよび3C10抗体は精製標品を使用した。

その結果を図3に示す。抗体を加えないときのIL-6産生量を100%とした。F1024-1-3抗体及び3C10抗体にIL-6産生阻害活性が認められたが、コントロール抗体添加時のIL-6産生と比較して、F1024-1-3抗体は $0.3\mu g/mL$ で50%産生を阻害するのに対して3C10抗体は10%であり、F1024-1-3抗体は内皮細胞の炎症性サイトカイン産生阻害効果が3C10抗体よりも優れていることが明らかとなった。

また、実施例2のスクリーニングで選択された物質が、実際に細胞のサイトカインを抑制することが明らかとなった。

(実施例4)

F1024-1-3抗体のLPS/CD14複合体系形成後のIL-6産生抑制測定

実施例3と同様にヒト血管内皮細胞HUVVEC(三光純薬社)を懸濁し、 5×10^4 細胞/Well(50μl/Well)で96ウェルプレートに植え込み37℃、5%CO₂の条件下で24時間培養した。可溶型CD14を除去したヒト血清を14%含むRPMI1640培地を10μl、120ng/mlのLPS(E. coli 055:B5、Difco社)10μl、3.6μg/mlの血清由来可溶型CD14を10μl混合し、37℃下1時間インキュベーションしてLPS/CD14複合体を形成させた。その後LPS/CD14混合液に900ng/mlのF1024-1-3抗体または3C10抗体40μlを加えて細胞に添加した。さらに20時間培養を行った後、培養上清中のIL-6をヒトIL-6 EIAキット(アプライドバイオシステムズ社)で測定した。

IL-6の測定はヒトIL-6 EIAキット添付のプロトコールに従い、行った。なお、コントロール抗体のラットIgG(conAb)および3C10抗体は精製標品を使用した。

その結果を図4に示す。抗体を加えないときのIL-6産生量を100%とした。F1024-1-3抗体はIL-6産生阻害活性が認められたが、3C10抗体はコントロール抗体と同程度であり、LPS/CD14複合体形成後ではIL-6の産生抑制効果が認められなかった。以上の点より、F1024-1-3抗体は内皮細胞のLPS/CD14複合体形成後でも炎症性サイトカイン産生阻害効果があり、したがってすでにLPSが体内に進入した後の患者、すなわち敗血症と判断された後の患者でも症状の改善効果が期待できることが明らかとなつ

た。

(実施例 5)

F 1 0 2 4 - 1 - 3 抗体のL P S / C D 1 4 複合体への結合試験

細胞膜上のC D 1 4 とL P S の結合に対する抗C D 1 4 抗体の影響について、
フローサイトメトリー (Flow cytometry) 法により解析を行った
。

ヒト単球系細胞株T H P - 1 を4 0 n g / m l の1 α , 2 5 - ジヒドロキシビタミン (d i h y d r o x y v i t a m i n) D 3 (フナコシ社) で4 8 時間培養し、分化誘導させた後に、1 0 μ g / m l の抗C D 1 4 抗体 (3 C 1 0 あるいはF 1 0 2 4 - 1 - 3 抗体) を含むかまたは含まない培地 (1 0 % F B S を含むR PM I 1 6 4 0) 中にて3 7 ℃、3 0 分間インキュベーションした。その後に、
F I T C 標識L P S (S i g m a 社) を終濃度1 n g / m l で添加し、3 7 ℃で
さらに1 5 分間インキュベーションした。その後、直ちに等容量の氷冷したR P M I 1 6 4 0 培地を添加し、F A C S C a l i b u r (B D 社) を用い蛍光強度を測定した。

結果を図5に示す。図5に示すように、L P S のC D 1 4 結合によって観察される特異的蛍光が、3 C 1 0 抗体により完全に抑制されたが、F 1 0 2 4 - 1 - 3 では部分的にしか抑制されず、F 1 0 2 4 - 1 - 3 抗体はL P S のC D 1 4 への結合を抑制していないことが示された。

(実施例 6)

F1024-1-3抗体の認識領域の解析

F1024-1-3抗体が認識する領域を明らかにするため、ペプチドによる阻害実験、CD14C欠失改変体による結合実験、CD14アミノ酸置換改変体による結合実験を行なった。

(1) [CD14ペプチドの調製]

配列番号1に記載のCD14アミノ酸配列に基づき、ペプチドA（配列番号11）、ペプチドB（配列番号12）、ペプチドC（配列番号13）及びペプチドD（配列番号14）の4種類のペプチド及びコントロールとしてペプチドE（配列番号15）を合成した。すなわち、ペプチド合成機（432A、アプライドバイオシステムズ）を用いて、使用法に従いペプチドを合成し、定法に従って脱保護、切り出しを行い、C18カラム（CAPCELL-PAK、資生堂）を用いてHPLCにより精製した。精製分画を回収し、凍結乾燥後、重量を測定し、蒸留水で10mg/mlに溶解した。

(2) ヒトCD14のアミノ酸を欠失したCD14改変体（ヒト可溶型CD14欠失改変体）の調製

後述する実施例8に従った。

すなわち、ヒトCD14のC末端よりそれぞれ49、56、61、66、71、110、173、204アミノ酸を欠失させた組換え体（以下sCD14（1-307）、sCD14（1-300）、sCD14（1-295）、sCD14（1-290）、sCD14（1-285）、sCD14（1-246）、sCD14（1-183）、sCD14（1-152））（sCD14（1-307）は、配列番号1に記載のCD14のN末端1～307番目のアミノ酸を有す

る可溶性ポリペプチド、以下同様) を哺乳動物細胞で発現させるプラスミドを構築し、これらのプラスミドをCOS-1細胞に導入して、各種ヒト可溶型を得た。

また、sCD14(1-307)のアミノ酸配列より一部のアミノ酸を欠失させた各種ヒト可溶型CD14欠失変体(以下、欠失部分を△で示す)△7-1、△57-64、△180-234、△235-282、△180-282を哺乳動物細胞で発現させるプラスミドは実施例9-(1)のアミノ酸置換変体ポリペプチド発現プラスミドの構築と同様に行った。但し、使用したプライマーは、△7-11についてはセンスプライマー3(配列番号16)とアンチセンスプライマー3(配列番号17)及びセンスプライマー4(配列番号18)とアンチセンスプライマー4(配列番号19)を、△57-64についてはセンスプライマー3とアンチセンスプライマー5(配列番号20)及びセンスプライマー5(配列番号21)とアンチセンスプライマー4を、△180-234についてはセンスプライマー3とアンチセンスプライマー6(配列番号22)及びセンスプライマー6(配列番号23)とアンチセンスプライマー4を、△235-282についてはセンスプライマー3とアンチセンスプライマー7(配列番号24)及びセンスプライマー7(配列番号25)とアンチセンスプライマー4を、△180-282についてはセンスプライマー3とアンチセンスプライマー8(配列番号26)及びセンスプライマー8(配列番号27)とアンチセンスプライマー4をそれぞれ用いた。次に得られたプラスミドを実施例9-(2)に従い、COS-1細胞に導入し、ヒト可溶型CD14欠失変体を得た。

CD14変体の発現量を、抗ヒトCD14抗体を用いたELISAにて測定した

。すなわち、pH 8.3 の 10 mM NaHCO₃ 緩衝液にて 200 倍希釈した抗 CD14 抗体 MEM-18 (MONOSAN 社) を 96 ウェルプレート (Maxisorp, Nunc 社) に 50 μl / Well 添加し、4°C にて一昼夜静置した。その後、純水にて洗浄し、0.5% BSA を含む PBS⁻ にてブロッキングを行った (室温で 60 分間静置)。

次にウェル中の液を除去し、トランスフェクションした COS-1 の培養上清を 50 μl / Well 添加し、25°C で 60 分間インキュベーションした後に、0.1% Tween 20 を含む PBS⁻ で 3 回洗浄後、1.0 μg / ml の RP-conjugated 3C10 抗体 50 μl / Well を添加し、25°C で 60 分間インキュベーションを行った。0.1% Tween 20 を含む PBS⁻ で 5 回洗浄後、発色基質 (TMB) を 50 μl / Well 添加し室温で 30 分反応させた後に、停止液 (1N 硫酸) 50 μl / Well を加え反応を停止した。

450 nm の波長の吸光度を測定し、サンプルの CD14 改変体ポリペプチドの产生量を算出した。

次に、ヒト可溶型 CD14 C 末端欠失改変体が目的の長さであるかを確認するため、CD14 改変体の分子量を抗ヒト CD14 抗体 (3C10 および MEM-18) を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。すなわち各 CD14 改変体 30 ng / レーンを SDS-polyacrylamide gradient gel (5 - 20% ATTO 社) で電気泳動し、PVDF 膜 (日本ミリポア社) にタンパクを転写した後、0.5% スキムミルクを含む PBS 30 ml にて室温で 1 時間ブロッキング反応を行い、10 μg / ml の 3C10

および100倍希釈のMEM-18を添加して室温で1時間反応させた。さらにHRP-conjugated抗マウスIg抗体と室温で30分間反応させた後、ECLキット(Amersham Pharmacia Biotech社)を用い、検出した。その結果、各CD14改変体ポリペプチドの計算上の大きさにバンドが検出された。

(3) ヒトCD14アミノ酸置換改変体の調製

表中及び本明細書中においてsCD14(1-307)のN末端から283番目のアミノ酸LeuをAlaに置換したヒトsCD14(1-307)アミノ酸置換改変体ポリペプチドを「sCD14(1-307)L283A」と記載し、他のヒトsCD14(1-307)アミノ酸置換改変体ポリペプチドも同様に記載した。

後述する実施例8に記載の方法に従い、ヒトCD14(1-307)の種々の場所に1あるいは2アミノ酸変異を導入したヒトsCD14(1-307)アミノ酸置換改変体を哺乳動物細胞で発現させるプラスミドをCOS-1細胞に導入し、各種ヒトCD14アミノ酸置換改変体を調製した。

得られたCD14改変体を含む培養上清は、必要に応じて精製した。すなわち、抗ヒトCD14抗体(3C10)を結合したアフィニティー精製用カラム(HiTrapカラム(Amersham Pharmacia Biotech社))に供して選択的に吸着させ、pH勾配にて溶出した。得られた溶出画分はただちにpH8.0の1M HEPES緩衝液にて中和し、pHを中性とした。各画分はHRP-conjugated 3C10を用いたEIA法により検定し、CD14改変体ポリペプチドの含まれる画分を選択した。

(4) [ペプチドによる阻害実験]

精製 s CD 14 (1 - 356) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を炭酸緩衝液 (pH 9.5) に希釈し、プレート (Maxisorp, Nunc) に 37°C、1 時間で固相化した後、プレートを洗浄し、0.5% BSA/PBS でプロッキングした。プロッキング液を除去し、(1) で調製した各ペプチドを PBS で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、添加した。続けて、中根ら (J. Histochem. Cytochem. 22:1084, 1974) の方法によりペルオキシダーゼで標識した F 1024-1-3 抗体を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加し、37°C で 1 時間反応させた。

0.9% NaCl / 0.5% Tween 20 で 5 回洗浄し、H₂O₂/TMB 溶液を用いて発色させた後 0.5 M 硫酸で反応を停止し、結合した F 1024-1-3 抗体の量を測定した。

その結果、図 6 に示すように、F 1024-1-3 抗体はペプチド A、B では弱いながら阻止されたが、ペプチド C、D 及びコントロールに用いた無関係なペプチド E では阻止されず、F 1024-1-3 抗体の認識する領域は 283 番目のアミノ酸より 318 番目のアミノ酸の間にあることが推定された。

(5) [CD 14 欠失変体による抗体との結合実験]

プレート (Maxisorp, Nunc) に、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 3C10 抗体または 100 倍希釈した MEM-18 抗体を固相化し、0.5% BSA/PBS でプロッキングした。次に、プロッキング液を除去し、濃度を測定した各 CD 14 欠失変体を添加して室温で 1 時間反応した。洗浄後、10% RS / 0.1% Tween-20 / PBS に 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で希釈したペルオキシダーゼ標識 F 1024-1-3 抗体またはペルオキシダーゼ標識 3C10 抗体を添加し

、同様に室温で1時間半反応させた。洗浄後、H₂O₂／TMB溶液を用いて発色させた後0.5M硫酸で反応を停止し、吸光度を450nmの波長によりNJ-2100（日本インターメッド）プレート吸光度計で測定した。

固相に使用した3C10及びMEM-18抗体はそれぞれの結合サイトが7-11番目のアミノ酸、57-64番目のアミノ酸であることが明らかであるため、今回用いたCD14欠失体のうちCD14（△7-11）は3C10と結合せず、またCD14（△57-64）はMEM-18と結合しないが、他のCD14欠失体とは結合する。したがって、3C10／F1024-1-3系、MEM-18／F1024-1-3系、MEM-18／3C10系の3種類のサンドイッチELISA系の結果を解析することにより、それぞれの抗体の結合活性を解析できる。

得られた結果を解析したところ、図7に示すように、F1024-1-3抗体はsCD14（1-356）からsCD14（1-307）までは結合活性が認められ、また、3C10の結合サイトを欠失したCD14（△7-11）、MEM-18の結合サイトを欠失したCD14（△57-64）とも結合し、さらにsCD14（1-307）の180番目のアミノ酸より282番目のアミノ酸を欠失したCD14（△180-282）とも結合活性が認められた。このことから、F1024-1-3抗体は3C10、MEM-18抗体とは異なる抗体であり、また、結合領域は285番目よりC末端側であることが明らかになった。なお、sCD14（1-307）結合活性は他のCD14欠失体に比較して弱いため、表示を（+）で示した。

（6）[CD14アミノ酸置換変体による結合実験]

上記と同様な測定系を用いてCD14アミノ酸置換改变体の結合活性を測定した。その結果、図8に示すように294番目のアミノ酸をProからAlaに置換することによりF1024-1-3抗体の結合活性が失われ、このような現象は3C10、MEM-18抗体には認められなかった。F1024-1-3抗体がCD14の294番目のプロリンをポイントミューテーションすることにより結合しなくなることは、CD14の立体構造が変化したことが原因である。したがってF1024-1-3抗体は294番目のアミノ酸がProであることによって生じ得る立体構造を認識していることが明らかとなった。

(7) [ペプチドマッピングによる結合実験]

F1024-1-3抗体が認識するエピトープをさらに詳細に解析する目的で、SPOTs (GENOSYS) を用いて配列番号1に記載のCD14のアミノ酸番号246番目から345番目までの間のアミノ酸配列に基づき、2アミノ酸ずつC末側に配列をずらした10アミノ酸残基のペプチド46種類をメンブレン上に合成した。次にプロトコールに基づき、メンブレンをプロッキングし、一次抗体としてF1024-1-3抗体を反応させ、洗浄後二次抗体としてβガラクトシダーゼ標識抗ラットIgG F(ab')₂抗体 (American Qualex Antibodies) と反応させた。洗浄後、発色液を添加し青色のスポットが出現するのを確認したところ、F1024-1-3抗体由来のスポットは検出されず、ペプチドマッピングにより抗体のエピトープを決定することができなかった。このことはF1024-1-3抗体が10アミノ酸により構成されるリニアなペプチドをエピトープとはせず、立体的な構造に起因するエピトープを認識することを示唆している。

これらのことから、F1024-1-3抗体の結合領域は配列番号1のCD14の285番目のアミノ酸より315番目のアミノ酸に存在し、294番目のアミノ酸がProであることによって生じ得る立体構造を認識していることが明らかとなった。すなわち、該抗体はCD14の294番目のアミノ酸がProであることによって生じ得る立体構造の285番目のアミノ酸より315番目のアミノ酸に存在するエピトープを認識することが明らかとなった。

(実施例7)

抗CD14抗体のエピトープの範囲の解析

抗CD14抗体がF1024-1-3抗体と同じ機能を有するために必要な、抗CD14抗体のCD14上の認識部位の範囲を、実施例6で解析したF1024-1-3抗体のエピトープの周辺を中心に解析した。

モチーフを揃えるように多重整列した上で、あらためてその周囲の残基を含めて類似性スコアを計算し、挿入、欠失なく保存度の高い領域のみを抽出したデータベースであるBLOCKSデータベースを、ヒトCD14を対象として、プロファイル検索した。さらに、各種二次構造予測法 (Lev, GOR IV, PREDATOR) により解析した。

その結果、BLOCKSデータベースのプロファイル検索より、IL-1 (Accession NO. BL005253C) とその受容体の結合領域と類似性がある領域を、269番目から307番までの39アミノ酸残基と特定した。保存度が高いと推測されたアミノ酸残基（残基番号）は、Q (271) V (272) P (273) L (276) K (279) L (283) L (285) S (

286) C (287) P (294) E (298) L (299) P (300) E
 (301) N (304) L (305) T (306) であった。

さらに、この領域の287番からC末端側の配列は、LRR (PDB-ID: 1A4Y:A)との相同性が高くなかった。

また各種二次構造予測法 (Lev, GOR IV, PREDATOR) からは、 α -ヘリックス構造及び β -シート構造ともに一致した予測結果が得られないこと、一般的にプロリンが多く存在する場合ヘリックス構造やシート構造をとりにくいくこと、304番アスパラギンはモチーフデータベースの糖鎖結合モチーフと一致し、糖鎖結合可能部位であることから、この領域は蛋白質の表面に露出していることがわかった。

これらの解析より、該領域は、生理学的条件下では、ループが形成可能な領域であり、他の蛋白質と相互作用可能な部位であった。

すなわち、実施例6のF1024-1-3抗体のエピトープ及び、上記解析より、ヒトCD14とTLRとの結合を阻害することができる抗CD14抗体のエピトープの範囲は、ヒトCD14の269番から315番までの領域であった。

(実施例8)

ヒトCD14のC末端側のアミノ酸を欠失したCD14改変体ポリペプチド（ヒト可溶型CD14 C末端欠失改変体ポリペプチド）の作製

(1) [全長型sCD14発現プラスミド(pM1656)の構築]

まず、mCD14を哺乳動物細胞で発現させるプラスミドpM1650を構築した。WO98/39438に記載のプラスミドpUCH14P-4より、Xba

a I 及びH i n d III によりヒトCD14 c DNAを含む約1. 4 k bのDNA断片を切り出し、哺乳動物細胞発現ベクターであるp c DNA 3. 1 (-) (Invitrogen社) のXba I / H i n d III サイトに挿入した。その後、E. c o l i C o m p e t e n t C e l l s (JM109細胞、T a K a R a社) を添付のプロトコールに従い形質転換した後、生じたコロニーをPCRにより確認し、目的のmCD14を発現するプラスミド(p M 1 6 5 0)を得た。

次にヒトCD14を可溶型タンパクとして発現させるため、G P I アンカーリングに必要なサイトであるN末端から326番目のA s nと328番目のG l y(配列番号1参照)をそれぞれG l n、V a lに置換した組換え体発現プラスミドp M 1 6 5 6の構築を行った。すなわち、センスプライマー9(配列番号28)とアンチセンスプライマー9(配列番号29)を用い、上記p M 1 6 5 0を鑄型とし、T a K a R a E x T a q (T a K a R a社)により94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分のサイクルを30回繰り返しPCR反応を行った。増幅したDNA断片をX h o IとA p a L Iによりd o u b l e d i g e s t i o nし、p M 1 6 5 0のX h o I / A p a L Iサイトに挿入した。JM109細胞を形質転換した後、生じたコロニーをPCRにより確認し、目的のs CD14を発現するプラスミド(p M 1 6 5 6)を得た。

(2) [ヒト可溶型CD14 C末端欠失改変体ポリペプチド発現プラスミド(p M 1 6 5 8～p M 1 6 6 2およびp M 1 6 7 4～p M 1 6 7 6)の構築]

ヒトCD14のC末端よりそれぞれ49、56、61、66、71、110、173、204アミノ酸を欠失させた組換え体(以下s CD14 (1-307)

、 sCD14 (1-300)、 sCD14 (1-295)、 sCD14 (1-290)、 sCD14 (1-285)、 sCD14 (1-246)、 sCD14 (1-183)、 sCD14 (1-152)) を哺乳動物細胞で発現させるプラスミド pM1658、 pM1674、 pM1675、 pM1676、 pM1659、 pM1660、 pM1662 及び pM1661 は以下の方法で構築した。

まず、センスプライマー 9 とアンチセンスプライマー 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16 及び 17 (配列番号 30、 31、 32、 33、 34、 35、 36 及び 37) を用い、 (1) で作製したプラスミド pM1656 を鋳型とし、 Pyrobest DNA Polymerase (Takara社) により 98°C で 10 秒、 55°C で 30 秒、 72°C で 1 分のサイクルを 30 回繰り返し PCR 反応を行った。

次に増幅した DNA 断片を XhoI と HindIII により double digestion し、 1% アガロースゲル電気泳動により分離精製した。また pM1656 を同様に XhoI と HindIII で消化、 精製し、 得られた約 5.8 kb の DNA 断片と上記 PCR 断片を ligation した。 JM109 細胞を形質転換した後、 生じたコロニーを PCR により確認し、 目的の CD14 改変体ポリペプチドを発現するプラスミド (pM1658、 pM1674、 pM1675、 pM1676、 pM1659、 pM1660、 pM1662 及び pM1661) を得た。

(3) [COS-1 細胞での発現]

(1) 及び (2) で作製したプラスミド pM1656、 pM1658～pM1662 及び pM1674～pM1676 を COS-1 細胞に下記の方法で導入し

、 sCD14 (1-356) 、 sCD14 (1-307) 、 sCD14 (1-300) 、 sCD14 (1-295) 、 sCD14 (1-290) 、 sCD14 (1-285) 、 sCD14 (1-246) 、 sCD14 (1-183) 及び sCD14 (1-152) を発現させた。すなわち FUGENE 6 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) 50 μl を上記プラスミドDNA各 1.2. 5 μg と添付プロトコールに従い混合し、150 cm² フラスコにセミコンフルエントに増殖した COS-1 細胞に添加した。5% CO₂ 、37℃の条件下で 72 時間培養した後に、培養上清を回収し目的の CD14 改変体ポリペプチドを得た。

CD14 改変体ポリペプチドの発現量を、抗ヒト CD14 抗体を用いた EIA にて測定した。すなわち、pH 8.3 の 10 mM NaHCO₃ 緩衝液にて 200 倍希釈した抗 CD14 抗体 MEM-18 (MONOSAN 社) を 96 ウェルプレート (Maxisorp, Nunc 社) に 50 μl/well 添加し、4℃にて一昼夜静置した。その後、純水にて洗浄し、0.5% BSA を含む PBS- にてブロッキングを行った (室温で 60 分間静置)。

次に well 中の液を除去し、トランスフェクションした COS-1 の培養上清を 50 μl/well 添加し、25℃で 60 分間インキュベーションした後に、0.1% Tween 20 を含む PBS- で 3 回洗浄後、1.0 μg/ml の RP-conjugated 3C10 抗体 50 μl/well を添加し、25℃で 60 分間インキュベーションを行った。0.1% Tween 20 を含む PBS- で 5 回洗浄後、発色基質 (TMB) を 100 μl/well 添加し室温で 30 分反応させた後に、停止液 (1N 塩酸) 100 μl/well を加え反応を停止した。

450 nmの波長の吸光度を測定し、サンプルのCD14改変体ポリペプチドの產生量を算出した。

(4) [ヒト可溶型CD14C末端欠失改変体ポリペプチドの精製]

(3) にて得られたCD14改変体ポリペプチドを含む培養上清は、抗ヒトCD14抗体(3C10)を結合したアフィニティー精製用カラム(HiTrapカラム(Amersham Pharmacia Biotech社))に供して選択的に吸着させ、pH勾配にて溶出した。得られた溶出画分はただちにpH 8.0の1M HEPES緩衝液にて中和し、pHを中性とした。各画分はHRP-conjugated 3C10を用いたEIA法により検定し、CD14改変体ポリペプチドの含まれる画分を選択した。

(5) [ヒト可溶型CD14C末端欠失改変体ポリペプチドの検出]

CD14改変体ポリペプチドの分子量を抗ヒトCD14抗体(3C10およびMEM-18)を用いたWestern blottingにより確認した。すなわち各CD14改変体ポリペプチド30ng/ laneをSDS-polyacrylamide gradient gel(5-20% ATTO社)で電気泳動し、PVDF膜(日本ミリポア社)にタンパクを転写した後、0.5% skim milkを含むPBS-30mlにて室温で1時間ブロッキング反応を行い、10μg/mlの3C10および100倍希釈のMEM-18を添加して室温で1時間反応させた。さらにHRP-conjugated抗マウスIg抗体と室温で30分間反応させた後、ECL kit(Amersham Pharmacia Biotech社)を用い、検出した。その結果、各CD14改変体ポリペプチドの計算上の大きさにバンドが検出された。(図9)

(実施例 9)

ヒト CD14 アミノ酸置換改変体ポリペプチドの作製

(1) [s CD14 (1-307) のアミノ酸を置換した CD14 改変体ポリペプチド (ヒト s CD14 (1-307) アミノ酸置換改変体ポリペプチド) 発現 プラスミドの構築]

表中及び本明細書中において s CD14 (1-307) の N 末端から 283 番目のアミノ酸 L e u を A l a に置換したヒト s CD14 (1-307) アミノ酸置換改変体ポリペプチドを「 s CD14 (1-307) L 283 A 」と記載し、他のヒト s CD14 (1-307) アミノ酸置換改変体ポリペプチドも同様に記載した。

ヒト CD14 (1-307) の種々の場所に 1 あるいは 2 アミノ酸変異を導入したヒト s CD14 (1-307) アミノ酸置換改変体ポリペプチドを作製するために、以下の方法で哺乳動物細胞発現プラスミドを作製した。

s CD14 (1-307) K 279 A を発現するプラスミド pM1673 は、センスプライマー 3 とアンチセンスプライマー 18 (配列番号 38) あるいはセンスプライマー 10 (配列番号 39) とアンチセンスプライマー 4 を用い、実施例 8-(2) で作製したプラスミド pM1658 を鋳型とし、Pyrobest DNA Polymerase (Takara 社) により 98°C で 10 秒、55°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 30 回繰り返し PCR 反応を行った。

アンチセンスプライマー 18 とセンスプライマー 10 には Lys をコードする

配列の代わりにA I aをコードする配列G C T（アンチセンスプライマーはA G C）を用いた。これらのP C Rによって増幅されたDNA断片を1%アガロースゲル電気泳動によって分離回収し、K l e n o w F r a g m e n t（T a K a R a社）を用いてDNA断片の末端を平滑化した。

次にこれらの断片のm i x t u r eを铸型に、センスプライマー3とアンチセンスプライマー4を用い、上記と同様の条件で再度P C R反応を行った。2度目のP C Rで増幅されたDNA断片をX h o IとH i n d IIIによりd o u b l e d i g e s t i o nし、p M 1 6 5 6をX h o IとH i n d IIIで消化することにより得られる約5. 8 k bのDNA断片とl i g a t i o nした。J M 1 0 9細胞を形質転換した後、生じたコロニーをP C Rにより確認し、目的のC D 1 4改变体ポリペプチドを発現するプラスミド（p M 1 6 7 3）を得た。

また同様に、N末端から282番目のV a l、283番目のL e u、284番目のA s p、285番目のL e u、286番目のS e r、287番目のC y s、289番目のA r g、294番目のP r o、296番目のP r o、294番目及び296番目のP r oあるいは300番目のP r oをそれぞれA I aへ置換したs C D 1 4 (1-307) V 2 8 2 A、s C D 1 4 (1-307) L 2 8 3 A、s C D 1 4 (1-307) D 2 8 4 A、s C D 1 4 (1-307) L 2 8 5 A、s C D 1 4 (1-307) S 2 8 6 A、s C D 1 4 (1-307) C 2 8 7 A、s C D 1 4 (1-307) R 2 8 9 A、s C D 1 4 (1-307) P 2 9 4 A、s C D 1 4 (1-307) P 2 9 6 A、s C D 1 4 (1-307) P 2 9 4 / 2 9 6 Aあるいはs C D 1 4 (1-307) P 3 0 0 Aを発現するプラスミド（p M 1 6 6 3、p M 1 6 7 7、p M 1 6 6 4、p M 1 6 7 8、p M 1 6 6 5、p M

1666、pM1667、pM1669、pM1670、pM1671あるいはpM1672)は、それぞれ置換を導入するアミノ酸のコドン配列をA1aのコドン配列GCTあるいはGCG(アンチセンスプライマーはAGCあるいはCGC配列)に変えたアンチセンスプライマー19、20、21、22、23、24、25、26、27、28および29(配列番号40、41、42、43、44、45、46、47、48、49及び50)とセンスプライマー11、12、13、14、15、16、17、18、19、20および21(配列番号51、52、53、54、55、56、57、58、59、60及び61)を用い、pM1673と同様の方法で作製した。

さらにsCD14(1-307)R289Dを発現させるプラスミド(pM1668)も同様に構築した。この際、Aspへの置換のためArgのコドン配列(AGA)をAspのコドン配列GAT(アンチセンスプライマーはATC)に変えたセンスプライマー22(配列番号62)及びアンチセンスプライマー30(配列番号63)を用いた。

さらに、286番目のSerをCys、Gly、Thr、Leuにそれぞれ置換した改変体を発現するプラスミドを作製した。構築方法はsCD14(1-307)S286A発現プラスミドの構築と同様で、Cys置換の場合はセンスプライマー23(配列番号64)及びアンチセンスプライマー31(配列番号65)を用いた。Gly置換の場合はセンスプライマー24(配列番号66)及びアンチセンスプライマー32(配列番号67)を、Thr置換の場合はセンスプライマー25(配列番号68)及びアンチセンスプライマー33(配列番号69)を、Leu置換の場合はセンスプライマー26(配列番号70)及びアンチセ

ンスプライマー 34（配列番号 71）を用いて構築を行った。

(2) [ヒト sCD14(1-307) アミノ酸置換改変体ポリペプチドの生産及び精製]

ヒトアミノ酸置換 sCD14(1-307) 改変体ポリペプチドの COS-1 細胞での生産及び上清中の発現量測定は実施例 8-(3) と同様の方法で行った。
。

各 CD14 改変体ポリペプチドの発現量を表 1 及び表 2 に示す。

表 1

ヒト sCD14(1-307)アミノ酸置換改変体ポリペプチドの
COS 細胞における発現量

Name	COS-1 細胞培養上清中 での発現量 (μ g/ml)
sCD14(1-356)	3.38
sCD14(1-307)	2.99
sCD14(1-307)L283A	0.44
sCD14(1-307)D284A	0.46
sCD14(1-307)L285A	0.11
sCD14(1-307)S286A	0.80
sCD14(1-307)C287A	2.44
sCD14(1-307)N288A	0.11
sCD14(1-307)R289A	0.51
sCD14(1-307)R289D	0.96
sCD14(1-307)P294A	0.69
sCD14(1-307)P296A	0.60
sCD14(1-307)P294/296A	0.67
sCD14(1-307)P300A	検出されず

表2

ヒトアミノ酸置換 sCD14 (1-307) 改変体ポリペプチドの
COS 細胞における発現量

Name	Expression in COS cells ($\mu\text{g/ml}$)
sCD14(1- 307) S286A	0.80
sCD14(1- 307) S286C	4.36
sCD14(1- 307) S286G	0.178
sCD14(1- 307) S286T	6.05
sCD14(1- 307) S286L	0.076

s CD 1 4 (1 - 3 0 7) P 3 0 0 A では上清中への発現が確認できなかった。さらに、発現量の低かった s CD 1 4 (1 - 3 0 7) S 2 8 6 L 以外の C D 1 4 (1 - 3 0 7) 改変体ポリペプチドは各プラスミドをトランスフェクションした C O S - 1 培養上清中から実施例 8 - (4) と同様の方法で精製した。

3) ヒト s CD 1 4 (1 - 3 0 7) アミノ酸置換改変体ポリペプチドの検出
各 C D 1 4 改変体ポリペプチドの検出は可溶型 C D 1 4 C 末端欠失改変体ポリペプチドの検出と同様の方法で W e s t e r n b l o t t i n g により行った。ヒト s CD 1 4 (1 - 3 0 7) アミノ酸置換改変体ポリペプチドは全て s C D 1 4 (1 - 3 0 7) と同じ分子量を示した。

(実施例 10)

CD14 改変体ポリペプチドの IL-6 產生阻害活性

900 ng/ml の F1024-1-3 抗体 40 μl 添加の代わりに 900 ng/ml の CD14 改変体ポリペプチド 40 μl 添加した以外、実施例 3 に記載の方法と同様に行った。

その結果を図 10、図 11 及び図 12 に示す。

IL-6 產生阻害活性は sCD14 (1-285)、sCD14 (1-246) 及び sCD14 (1-183) でそれぞれ 67.5、45.4、42.6 % で、最も強い阻害活性を示した CD14 改変体ポリペプチドは sCD14 (1-285) であった。

また、sCD14 (1-307) D284A、sCD14 (1-307) S286A でそれぞれ 81.3、79.6 % と強い阻害活性がみられた。また sCD14 (1-307) C287A では 24.4 % と弱い活性が確認された。

また、286 番目の Ser の改変体の阻害活性は sCD14 (1-307) S286G が一番強く、sCD14 (1-307) S286C は sCD14 (1-307) S286A とほぼ同等の阻害活性を示した。

(実施例 11)

CD14 改変体ポリペプチドの IL-6 產生誘導活性

CD14 改変体ポリペプチドが HUVEC 細胞に IL-6 產生誘導活性を示すか下記方法により確認を行った。すなわち、実施例 10 と同一の方法で HUVEC 細胞を 96 ウエルプレートに巻き込み、24 時間培養した後に、可溶型 CD1

4を除去したヒト血清を7%含むRPMI1640培地を20μl、120ng/mlのLPS(E. coli 055:B5、Difco社)10μl及び900ng/mlのCD14改変体ポリペプチド40μlをウェルに添加した。さらに20時間培養を行った後、培養上清中のIL-6をhuman IL-6 EIA kit(PE Biosystems社)で測定した。

その結果を表3に示す。実施例10でIL-6阻害活性を示さなかったsCD14(1-356)、sCD14(1-307)及びsCD14(1-152)並びに阻害活性を示したsCD14(1-183)及びsCD14(1-307)C287AでIL-6の產生誘導が確認された。

実施例10で阻害活性を示したsCD14(1-246)、sCD14(1-285)、sCD14(1-307)D284A及びsCD14(1-307)S286Aでは、IL-6の產生は測定の検出限界(50pg/ml)以下であった。すなわち、sCD14(1-246)、sCD14(1-285)、sCD14(1-307)D284A、sCD14(1-307)S286A及びsCD14(1-307)S286CはLPS存在下でIL-6产生を誘導せず、血清由来可溶型CD14とLPSとの複合体によるIL-6产生を阻害することが明らかになった。

表3

終濃度 300ng/mLでのIL-6産生量 (pg/mL)

sCD14(1-356)	216
sCD14(1-307)	203
sCD14(1-285)	検出されず
sCD14(1-246)	検出されず
sCD14(1-183)	86.7
sCD14(1-152)	149
sCD14(1-307)D284A	検出されず
sCD14(1-307)S286A	検出されず
sCD14(1-307)S286C	検出されず
sCD14(1-307)C287A	76.0
血清由来可溶型CD14低分子種	検出されず

(実施例 14)

蛋白質相互作用解析装置を用いた阻害機構の解析

(1) [49 kDa 高分子量の CD14 蛋白質特異的モノクローナル抗体の作製]

]

① 49 kDa 高分子量の CD14 蛋白質に特異的なペプチドの作製

配列番号 1 に記載の 316 番目から 328 番目の配列を、免疫に使用する 49 kDa 高分子量の CD14 特異的なペプチド（以下、ペプチド 13 と記載）として選択した。

なお、選択したペプチドを C 末端で SH 基を介してキャリア蛋白質と結合させるため、C 末端にシステインを挿入した。ペプチドの合成は ABI 432A ペプチド合成機（アプライド）を用いて行った。定法により樹脂よりペプチドの切り出し、C18 逆相 HPLC（CAPCELL-PAK、資生堂）を用いてペプチドを精製した。

② 合成ペプチドを用いたペプチドキャリア抗原の作製

① で作製したペプチドを蒸留水で 10 mg/mL に溶解し、10 mg/mL のマレイミド化キーホールリンペットヘモシアニン（KLH、PIERCE）と等量混合した。室温で 2 時間反応後、NAP-10 カラム（ファルマシア）で脱塩しペプチド 13 キャリア抗原（以下、ペプチド 13-KLH と記載）を得た。蛋白質濃度は使用した KLH 量を液量で割ったものを用いた。

③ 49 kDa 高分子量の CD14 蛋白質特異的モノクローナル抗体の作製

ペプチド 13-KLH 100 μg を免疫源とし、実施例 1 (1) に記載の方法と同様に細胞融合を行った。HAT 培地 (GIBCO) によりハイブリドーマを

選択し、1週間後、組換えヒトCD14蛋白質と反応する抗体を產生しているハイブリドーマのスクリーニングを行った。

まず0.01M炭酸緩衝液(pH9.5)により精製した組換えヒトCD14蛋白質を1 μ g/mLに希釈し、イムノプレート(Maxisorb, NUNC)の各ウエルに50 μ L添加した。37℃で1時間反応後、イオン交換水で5回洗浄し、0.5%BSAを含むPBSを各ウエルに100 μ L添加しブロッキングを行った。次に選択したハイブリドーマからサンプリングした培養上清を各ウエルに添加し37℃で1時間反応させた後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体(DAKO)を10%ウサギ血清を含むPBSで1000倍に希釈し各ウエルに50 μ L添加した。37℃で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジン溶液を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。その結果、高分子量のCD14蛋白質と反応したハイブリドーマを含むウエル(F1025-4-1)を選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。

選択したハイブリドーマを1.0%FCS/RPMI-1640培地(GIBCO)で培養後、Hybridoma-SFM培地(GIBCO)で培養し抗体を產生させ、Prosep-Gカラム(Bioprocessing)を用いて抗体を精製した。精製したF1025-4-1抗体のサブタイプはラットIgG1/ κ であった。

④HRP標識抗体の作製

(実施例 12)

末梢マクロファージ及び単球における CD14 改変体ポリペプチドの TNF α 產生阻害活性

健常人末梢血より以下の方法で末梢マクロファージ及び単球を単離した。まず、ヘパリンを添加したヒト末梢血 200 ml を PBS⁻ で 2 倍に希釈し、 Ficoll Paque (Amersham Pharmacia Biotech 社) 21 ml に 28 ml ずつ重層した。室温、 1500 rpm で 30 分遠心分離後、単核球画分を回収した。次に MACS システム (第一化学薬品社) を用い、マクロファージ及び単球を単離した。すなわち、比重遠心分離により回収した単核球を抗 CD14 抗体磁気ビーズ (第一化学薬品社) と反応させた後に、分離ラム RS+ (第一化学薬品社) を用い、 CD14 陽性細胞をポジティブセレクションした。

得られた末梢マクロファージ及び単球を 2% CD14 w/o HS/RPMI に浮遊させ、 0.5×10^5 cells/well ($50 \mu l$ /well) で 96 ウエルプレートに植え込み、 37°C, 5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。

可溶型 CD14 を除去したヒト血清を 7% 含む RPMI 1640 培地を $20 \mu l$ 、 $120 \text{ ng}/\text{ml}$ の LPS (E. coli 055 : B5, Difco 社) $10 \mu l$ 及び種々の濃度の CD14 改変体ポリペプチド $40 \mu l$ をウェルに添加しさらに 4 時間培養を行った後、培養上清中の TNF α を hTNF- α ELISA SYSTEM (Amersham Pharmacia Biotech 社) で測定した。測定方法は Kit 添付のプロトコールに従った。すなわち、適

切に希釈した培養上清 $50\mu l$ を反応プレートに移し、 $50\mu l$ のビオチン化抗体溶液を加えて室温で2時間静置した。反応液を除去し $400\mu l/well$ の洗浄液で4回各ウェルを洗浄した。次に適切に希釈したペルオキシダーゼを標識したストレプトアビジン溶液を $100\mu l$ 加え、さらに室温で30分間静置した。洗浄後、発色基質を $100\mu l$ を添加し室温で15分間反応させた。停止液 $100\mu l$ を加え反応を停止し、 450nm の波長の吸光度を測定し、TNF α 量を算出した。

その結果、実施例10でIL-6産生阻害活性の見られたヒト可溶型CD14C末端欠失改変体ポリペプチドであるsCD14(1-285)、sCD14(1-246)、sCD14(1-183)及びヒトsCD14(1-307)アミノ酸置換改変体ポリペプチドであるsCD14(1-307)D284A、sCD14(1-307)S286AでTNF α 産生阻害活性が確認された。(図13)

(実施例13)

CD14改変体ポリペプチドのヒトTLR4発現形質転換株におけるNF- κ B活性化阻害試験

実施例2(2)の記載と同様に、sCD14(1-307)S286Cを用いて、ヒトTLR4発現形質転換株におけるNF- κ B活性化阻害試験を行った。その結果、sCD14(1-307)S286Cは、添加濃度依存的に抑制活性を示した。(図14)

0. 5 mg のペルオキシダーゼ（東洋紡）を蒸留水に溶解し、蒸留水で溶解した 100 mM の過ヨウ素酸を添加し 25 °C で 20 分間反応した。反応終了後 1. 5 % エチレングリコールを添加し 25 °C で 10 分間反応後 1 mM 酢酸緩衝液（pH 4. 4）に対して透析した。精製 F1025-4-1 抗体を 10 mM 炭酸緩衝液（pH 9. 5）で透析し、0. 5 mg に対して 1 M 炭酸緩衝液（pH 9. 5）を添加して活性化した 0. 5 mg のペルオキシダーゼをそれぞれの抗体と等量に混合し 25 °C で 2 時間反応した。4 mg / mL の水素化ホウ素ナトリウムを添加し さらに 2 時間 4 °C で反応した。反応液を PBS に透析し ペルオキシダーゼ標識抗体を得た。液量を測定し 使用した抗体量より抗体濃度を算出した。

(2) [F1024-1-3 抗体の阻害機構の解析]

①組み換え TLR4 の発現

COS-1 細胞 (ATCC : CRL 1150) を 3×10^5 cells / 75 cm² のフラスコに接種し、37 °C 5 % CO₂ 下で一昼夜培養した。翌日、実施例 2 (1) 記載のプラスミド pCDNAT4 を用いて FuGENE 6 (Roche) 記載のプロトコールにしたがって 6. 25 μg DNA : 25 μl FuGENE 6 の比率で混合し、1 % FBS / DMEM (Sigma、高グルコース) を 15 mL 添加したフラスコに加え、37 °C 5 % CO₂ 下で 48 時間培養した。また、プラスミドを含まないで同様に操作した COS-1 細胞をネガティブコントロールとした。TLR4 分子を細胞膜上に発現した COS-1 細胞（以下、TLR4-COS と記載する）、及び発現していない COS-1 細胞の上清を廃棄し、PBS - (Sigma) で 2 回細胞を洗浄した。次に 1 % EDTA / PBS - 溶液を 5 mL 添加し、軽く攪拌後、セルスクレイパー (COSTAR) を用い

て細胞を培養フラスコより剥がし、50mLの遠沈管に回収した。フラスコをさらに5mLのPBSで洗浄し、50mL遠沈管に加え、1000 rpmで10分間遠心し、細胞を沈殿させた後上清を廃棄し、さらに2回PBSで細胞を洗浄した。次に洗浄した細胞を40μmのセルストレイナー(FALCON)でろ過し、細胞数をカウントした。一度遠心し、 5×10^5 cells/mLとなるようにPBSで希釈し4°Cで保存した。

②抗FITC抗体固定化チップの調製

BIACORE 3000(BIACORE社)の解析に使用するチップ上のセルに抗FITCモノクローナル抗体(OEMconcept社)を固定化するため、ピアコア社マニュアルに従い、NHS/EDC溶液(BIACORE社)によりセルを7分間活性化後、pH 6.0の酢酸緩衝液で50μg/mLに希釈した抗体をマニュアルインジェクション法により添加し抗体を固定化後、エタノールアミンによりプロッキングを行った。リファレンスは未処理セルを使用した。

③FITC-LPS/CD14複合体の調製

PBS-(pH 7.4)で6μg/mLに希釈したFITC-LPS(Sigma, Serotype 0111:B4)と実施例8で調製した組み換え sCD14(1-356) 300μg/mLを1:1混合し、37°Cで30分間静置することにより複合体を形成した。複合体の形成は抗FITC抗体固相化プレートと(1)で調製したペルオキシダーゼ標識抗CD14抗体(F1025-4-1)を用いたELISA系で確認した。すなわち、抗FITC抗体を10μg/mLでプレートに固相化し、0.5%牛血清アルブミン/PBSでプロッキング

した。次に調製した FITC-LPS/CD14複合体、FITC-LPS、sCD14の3種類のサンプルを抗体固相化ウエルに添加し、37°Cで1時間反応した。各ウエルを洗浄後、1 μg/mLに希釈したペルオキシダーゼ標識抗CD14抗体と反応させ、洗浄後TMB発色基質溶液(BioFix、フナコシ)により反応させ、適度な発色が得られた段階で、硫酸で反応を停止し、450 nmの吸光度を測定した。その結果、FITC-LPS、sCD14単独では吸光度の上昇が見られないのに対してFITC-LPS/CD14複合体でのみ吸光度が上昇し、複合体が形成されていることが確認された。

④阻害機構の解析

調製したFITC-LPS/CD14複合体をチップ上に結合し、次にHBS-EP緩衝液で130 μg/mLに希釈したF1024-1-3抗体をインジェクとし固定化したCD14に抗体を結合した。次にTLR4-COS細胞、コントロールとしてCOS細胞を添加し、TLR4-COS細胞、COS細胞の結合量を測定した。図15に結果を示したが、棒グラフの高さはセル上に結合した量を示している。すなわち、セルにLPS/CD14複合体が結合することによりレスポンスの上昇が観察された。次にCOS細胞ではレスポンスが観察されなかったことから結合が認められなかった。一方、TOLL4-COS細胞ではレスポンスの上昇(200 RU)が観察され、結合が確認された。LPS/CD14に抗体を反応させると同様にレスポンスの上昇が観察され、結合が確認された。さらにCOS細胞、TOLL4-COS細胞を反応させると、それぞれにレスポンスの上昇(TOLL4-COS細胞で136 RU、COS細胞で115 RU)が観察された。COS細胞のレスポンスの上昇は細胞と抗体の非特異的な結合に

由来するため、以下の式を用いて阻害率を算出したところ、阻害率は90%であった。このことはF1024-1-3抗体がCD14に結合することにより、TLR4とCD14の結合が阻害されたことを示しており、F1024-1-3抗体の抑制機構がTLR4のCD14への結合阻害によることが明らかとなった。阻害率の算出は (F1024-1-3抗体なしでのTLR4-COS (TOLL4-COS) 細胞のレスポンス) - { (F1024-1-3抗体結合時のTOLL4-COS細胞のレスポンス) - (F1024-1-3抗体結合時のCOS細胞のレスポンス) } / (F1024-1-3抗体なしでのTOLL4-COS細胞のレスポンス) × 100 (%) により算出した。

(2) [CD14改変体ポリペプチドの阻害機構の解析]

①CD14チップの作製

BIA CORE 3000の解析に使用するチップ上のセルにsCD14(1-356)を固定化するため、ピアコア社マニュアルに従い、NHS/EDC溶液(ピアコア)によりセルを14分間活性化後、pH4.0の酢酸緩衝液で200 μg/mLに希釈したsCD14(1-356)をマニュアルインジェクション法により添加し sCD14(1-356)を固定化後、エタナールアミンによりブロッキングを行った。リファレンスは未処理セルを使用した。

②CD14/LPS/TLR4複合体の形成

調製したチップをBIA CORE 3000に設置し、ピアコア社マニュアルに従い、HBS-EP緩衝液(ピアコア)を用いて10 μL/minの流速でセンサーグラムを開始した。まず、sCD14(1-307)(S286C) 10 μg/mL、COS細胞 1.7×10^5 cells/mL、Toll4-COS細

胞1. 7×10^5 cells/mLをそれぞれ5 μ Lインジェクトしたところ、3者ともsCD14(1-356)への結合は観察されなかった。次に、sCD14(1-356)セルにLPS(Sigma, Serotype 055:B5)を1 μ L/mLの流速で30 μ Lインジェクトし結合させ、続けて1%ヒト血清(可溶型CD14を実施例3記載の方法により除去したもの)を含むPBSで1. 7×10^5 cells/mLに調製したTo114-COS細胞を5 μ LインジェクションしLPS/CD14/TLR4複合体の形成を行わせたところ、結合が確認された。(図16)。

③阻害機構の解析

2Mチオシアノ酸溶液で複合体を解離後、LPSを同条件で再度結合した。次に、1. 7×10^5 cells/mLのTo114-COS細胞と33 μ g/mLのsCD14(1-307)(S286C)を混合し、室温で20分間反応させた。LPSのインジェクション終了後、その混合溶液を流速10 μ L/minで5 μ Lインジェクトしたところ、sCD14(1-307)(S286C)存在下ではTo114-COS細胞のsCD14(1-356)/LPS複合体への結合がほぼ100%抑制された。(図16)

(実施例15)

LPS結合実験

sCD14(1-356)、sCD14(1-307)あるいはsCD14(1-307)S286A(各終濃度20 μ g/mL)とLPS(終濃度100 μ g/mL)を混合し、37°Cで16時間インキュベーションした。これらの反応

液を7.5%のSDS無添加polyacrylamide gel (ATT
O社)にて300V定圧で5時間泳動した後にPVDF膜にタンパクを転写した。
。

その後、実施例8と同様の方法でWestern blottingを行い、
sCD14のバンドを検出した。ただし、抗CD14抗体としては、精製した健
常人血清中sCD14を抗原としてラットに投与して得たラット血清、すなわち
ラット抗ヒトCD14抗血清を、また2次抗体としてはHRP-conjugated
抗ラットIg抗体(DAKO社)を用いた。

その結果、sCD14(1-356)、sCD14(1-307)及びsCD
14(1-307)S286Aの全てにおいて分子量の移動が見られ、これらは
LPSと結合することが確認された。(図17)

(実施例16)

ヒト血中由来可溶型CD14低分子種ポリペプチドの調製

(1) [ヒト血中由来可溶型CD14低分子種ポリペプチドの精製]

まず、実施例8-(4)に示す方法で精製したヒト血清由来の可溶型CD14を
、F1024-1-3抗体を結合したアフィニティー精製用カラム(HiTrap
pカラム, Amersham Pharmacia Biotech社)に供して高
分子種の可溶型CD14を除去した。得られた未吸着画分は凍結乾燥法にて濃縮
し、実施例8に記載した抗CD14抗体を用いたEIA法により濃度を決定した
。その結果、血清由来可溶型CD14低分子種の血清中の可溶型CD14全体に
占める割合は5%未満であった。

111

(2) [ヒト血清由来可溶型CD14低分子種ポリペプチドの検出]

(1) に示す方法で得られたヒト血清由来可溶型CD14の各分画の分子量を抗ヒトCD14抗体(3C10およびMEM-18)を用いたWestern blottingにより確認した。すなわちヒト血清由来可溶型CD14分画を実施例8(5)に示す方法で分析した。分析結果を図18に示す。

その結果、ヒト血清由来可溶型CD14は49kDa、55kDaの位置(Lane 1)に、ヒト血清由来可溶型CD14低分子種ポリペプチドは36kDaの位置にバンドが検出された(Lane 2)。

また、CD14低分子種ポリペプチドは実施例8で作製したCD14改変体ポリペプチド(図9)のsCD14(1-285)とsCD14(1-246)の間に位置していることが確認された。また、3C10抗体と結合することより、CD14の7番目以降のアミノ酸は維持されていることがわかる。これらより、CD14低分子種はCD14のN末端は1~6であり、C末端は246~285の間にあることがわかった。

なお、ヒト血清由来可溶型CD14(Lane 1)において36kDaの分子が検出されないのは49kDa、55kDaの分子に比べ、ヒト血清由来可溶型CD14に含まれる36kDaの分子が微量のためである。

さらに、得られた血清由来可溶型CD14低分子種ポリペプチド100ng/LaneをSDS-polyacrylamide gradient gel(5-20%ATTO社)で電気泳動し、2D-銀染色試薬・II「第一」キット(第一化学薬品社)を用いて蛋白の銀染色を行った。その結果、ヒト血清由来可溶型CD14低分子種ポリペプチドは36±5kDaの位置にややプロード

な単一バンドとして検出され、実質的に精製されたことが確認できた。

(実施例 17)

CD14低分子種の細胞傷害阻害活性

ヒト血管内皮細胞H U V E C (三光純薬社) を実施例3に示す方法で剥離し、
2% CD14 w/o H S / R P M I に懸濁して 5×10^4 c e l l s / w e l l
($50 \mu l$ / w e l l) で 96 ウエルプレートに植え込み 37°C 、5% CO₂ の
条件下で 24 時間培養した。

3.6 ng / m l の L P S (E. c o l i 0 5 5 : B 5, D i f c o 社) 10
 μl 、これに 7.2 μg / m l の組換え体可溶型 CD14 (s CD14 (1-3
5 6)) を単独で $50 \mu l$ 、あるいはさらに 9.6 μg / m l のヒト血清由来可
溶型 CD14 低分子種ポリペプチドを加えた混合液 $50 \mu l$ を添加し、可溶型 C
D14 を除去したヒト血清を 14% 及び Cycloheximide (Sigma
m a 社) を 144 μg / m l 含む R P M I 1 6 4 0 培地を $10 \mu l$ 添加して、1
8 時間培養した。

その後、12 μl の M T T 標識試薬 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を
添加して 4 時間さらに培養後、120 μl の可溶化溶液 (ロシュ・ダイアグノス
ティックス社) を加え、1昼夜暗所に置き、600 nm の吸光度を測定して細胞
傷害度を測定した。

その結果を図 19 に示す。s CD14 (1-356) 単独では上記条件下にお
いて 53% 傷害活性を示したが、CD14 低分子種ポリペプチドの添加により細
胞傷害活性は完全に阻害された。

(実施例 18)

CD14低分子種のIL-6産生阻害活性

900 ng/m1のF1024-1-3抗体40 μl添加の代わりに900 ng/m1のCD14低分子種40 μl添加した以外、実施例3に記載の方法と同様に行った。

その結果を図10に示す。CD14低分子種のIL-6産生阻害活性は86.7%であった。

(実施例 19)

CD14低分子種のIL-6産生誘導活性

900 ng/m1のCD14改変体ポリペプチド40 μl添加の代わりに900 ng/m1のCD14低分子種40 μl添加した以外、実施例11に記載の方法と同様に行った。

その結果を表3に示す。CD14低分子種のIL-6の産生は測定の検出限界(50 pg/m1)以下であった。

(実施例 20)

ヒトTLR4発現形質転換株におけるサイトカイン産生阻害試験

実施例2(1)で得たHEKT4-14を24well-plateへ0.8 × 10⁵ cells/wellで植え込み、実施例2(2)と同様にF1024-1-3あるいはsCD14(1-307)S286Cの存在下もしくは非存在

下でLPS/sCD14で刺激した。20時間後に培養上清を回収し、上清中のIL-8産生量をEIAによって確認した。その結果、F1024-1-3、sCD14(1-307)S286C共に、添加濃度依存的に抑制活性を示した。
(図20)

(実施例21)

グラム陽性菌菌体成分に誘導されるIL-6産生阻害活性
(
ヒト腎由来細胞株U-373 MG(ATCC)を0.05%Trypsin,
0.53mM EDTAを含むPBS-で剥離後、RPMI1640培地(旭
テクノガラス社)にて懸濁し、 3×10^4 cells/well(100μl/
well)で96ウェルプレートに植え込み37℃、5%CO₂の条件下で24
時間培養した。RPMI1640培地を70μl、1μg/ml(w/v)のS
taphylococcus aureus cell suspension
(Sigma社)10μl、5μg/mlのsCD14(1-356)を10μ
l及び10μg/mlのCD14改変体ポリペプチド若しくはF1024-1-
3抗体10μlをウェルに添加し、さらに20時間培養を行った後、培養上清中
のIL-6をhuman IL-6 EIA kit(IL-6 Elisa
kit:GIBCO BRL社)で測定した。コントロールとして、CD14改変
体ポリペプチド、F1024-1-3抗体の代わりにsCD14(1-356)
を添加した。

IL-6の測定はhuman IL-6 EIA kit添付のプロトコール
に従い、行った。すなわち、1%(w/v)BSA/PBS(-)にて4倍希釈

した培養上清 $50\mu l$ をIL-6抗体固相化プレートに移し、ビオチン化抗ヒトIL-6抗体 $50\mu l$ を加え 37°C で60分間インキュベーションした。その後、反応液を除去し $400\mu l/\text{well}$ の $0.05\%(\text{v/v})\text{Tween}-20/\text{PBS}(-)$ で3回洗浄し、ペルオキシダーゼを標識したストレプトアビジン溶液を $100\mu l/\text{well}$ 加え、さらに 37°C 、20分間インキュベーションを行った。洗浄後発色基質(TMB)を $100\mu l/\text{well}$ を添加し室温で15分間反応させた後に、停止液(1M HCl) $100\mu l/\text{well}$ を加え反応を停止した。 450nm の波長の吸光度を測定し、サンプル中のIL-6の産生量を算出した。

その結果を図21に示した。sCD14(1-307)S286C及びF1024-1-3抗体のIL-6産生阻害活性はそれぞれ 48.1% 及び 55.2% であった。

この結果より、CD14改変体ポリペプチドおよびF1024-1-3がグラム陽性菌菌体成分に誘導されるサイトカイン産生を抑制することが示された。

(実施例22)

F1024-1-3抗体の交差反応性の確認

敗血症動物モデルにおけるF1024-1-3抗体の有用性を明らかにする目的でF1024-1-3抗体の各種動物由来CD14との交差反応性を検討した。まず、ヒト sCD14(1-356)を $50\text{ng}/\text{ウェル}$ でプレート(Maxisorp, Nunc)に固相化し、 $0.5\%\text{BSA}/\text{PBS}$ でブロッキングした。

イヌ(ピーグル)、サル(カニクイ、アカゲ)、ウサギ(ニュージランド白色

種)、ヒト(ポジティブコントロール)及びラット(ネガティブコントロール)の各血清をPBSで希釈したものを、ペルオキシダーゼ標識F1024-1-3抗体 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ と混合し、ブロッキング液を除去したプレートに添加した。プレートを37°Cで1時間反応し、洗浄液で5回洗浄後、0.02%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン発色液を添加し、10分間反応後0.5M硫酸で反応を停止した。プレートの吸光度を450nmの波長で測定した。4倍希釈血清の結果を図22に示す。

その結果、F1024-1-3抗体のヒトCD14への結合はウサギで52%、イヌで30%、アカゲで44%、カニクイで57%、ヒトで83%阻害され、F1024-1-3抗体はウサギ、イヌ、サルのCD14と交差反応性を示した。

次に、ウサギのCD14との結合をフローサイトメトリー法を用いて検討した。

ウサギ(ニュージーランド白色種、北山ラバース)オス、2.2kgの耳動脈よりウサギ全血1mLをヘパリンで濡らしたシリングで採血した。100μLに10mLのTris/NH₄C1溶液を加え、溶血させ、残った細胞分画を遠心して回収した。集めた細胞を5%牛血清/0.1%EDTA/PBSでブロッキングし、再度遠心し、細胞を回収した。

次に細胞を1mLの5%牛血清/0.1%EDTA/PBSに懸濁しF1024-1-3抗体、ヒト sCD14(1-356) 275ngでブレインキュベーションしたF1024-1-3抗体、ラットIgGをそれぞれ最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、4°Cで1時間反応した。細胞懸濁液を0.25%牛

血清／PBSで3回洗浄後、1000倍に希釈したFITC標識抗ラット抗体(DAKO)に再懸濁し、4℃で30分間反応した。再度、細胞を洗浄し、FACS解析をFACSCalibur(BD社)で行い、蛍光強度を測定した。

図23に示すように、ウサギ単球はF1024-1-3抗体で染色され、ヒトCD14で前処理することにより、染色が阻害された。また、コントロール抗体(ラットIgG)では染色されなかった。したがって、F1024-1-3抗体は単球上のウサギCD14と結合することが確認された。

(実施例23)

LPS負荷ウサギ敗血症モデルにおけるF1024-1-3抗体の有効性
敗血症モデルにおけるF104-1-3抗体の有効性を確認する目的で、LPS負荷ウサギ敗血症モデルを作製し、F1024-1-3抗体の有効性を抗体前投与及び後投与の2種類のプロトコールにより検討した。

(1) [F1024-1-3抗体の前投与効果]

① LPS前投与

LPS負荷ウサギ敗血症モデルは、Schimkeらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:13875, 1998)に準じ、LPS(Salmonella minnesota Re595、Sigma社)をニュージランド白色種(2.1-2.4kg、北山ラベス)に0、5、24時間毎に5μg/kgを耳静脈より投与することにより作製した。前投与群のプロトコールはF1024-1-3抗体を-1、4、23時間毎に2.5mg/kgを耳静脈より投与し、コントロール群は抗体の変わりに生食を投与した。

まず、体重により群れ分けを行い、各群5羽を選択し、-1時間に前採血を行なった。次に、1、3、5、7、23、25、28、48時間毎に採血を行い、体重、白血球数、血清GPT値、血清クレアチニン値、血清TNF α 値を測定した。なお、白血球数は Sysmex F-280（東亜医用電子）により、血清GPT値、血清クレアチニン値はDRI-CHEM5000（FUJIFILM）により測定した。

また、TNF α はDavidらの方法（Journal of Immunological Methods, 68: 167, 1984）に準じて、L929細胞(ATCC)を0.25%トリプシン/PBSで剥離後、5.5×10⁵細胞/mLに再懸濁し、5.5×10⁴細胞/ウェルでプレートに播種した。37℃、5%CO₂下で一晩培養後、上清を除きTNF標準品（ヒトTNF、持田）または希釈した検体100μLを添加し、続けて最終濃度5μg/mLとなるようにアクチノマイシンD（Sigma）を添加して、37℃、5%CO₂下で20時間培養した。

TNF量はプレートの培養上清を100μL除いた後、WST-1溶液（同仁化学）を10μL添加して、37℃で40～90分間インキュベーション後、450nmの吸光度を測定し、產生された血清中のTNF量を吸光度の相対値として表示した。さらに、48時間後の生存率をもって、F1024-1-3抗体の有効性を判定した。

まとめを、表4に示す。その結果、F1024-1-3抗体投与群では48時間後の生存率は100%（5/5）であったのに対して、生食投与群では40%（2/5）であり、F1024-1-3抗体投与により生存率は有意に改善され

た。また、28時間後の各パラメータの値もF1024-1-3抗体投与群で生食投与群に比較して前値に近い値を示した。

さらに、図24に示すように血清中のTNFの産生量はF1024-1-3抗体投与により抑制され、*in vivo*においても*in vitro*同様、炎症性サイトカインの産生をF1024-1-3抗体が抑制することが明らかとなった。

表4はF1024-1-3抗体のLPS負荷ウサギ敗血症モデルにおける前投与での死亡率の改善、各種パラメータの改善を示している。

表 4

	前値 (n=10)	F 1024-1-3抗体 投与群	生食投与群
48時間後生存率 (%)	—	100%	40 %
28時間後パラメータ			
白血球数 ($10^3/\text{mm}^3$)	6.6+/-0.7	8.2+/-2.7	2.1
GPT (U/L)	27+/-8	82+/-42	231
クレアチニン (mg/dL)	0.8+/-0.04	0.78+/-0.04	1.4
48時間後の体重 (kg)	2.4+/-0.04	2.35+/-0.02	2.07

② L T A / P e p G 前投与

さらに、グラム陽性菌に対する効果を確認する目的で、①と同様に試験を行った。LPSの変わりにLTA/PepGを投与し、F1024-1-3抗体の白血球減少症の改善効果を検討した。すなわち、F1024-1-3抗体（2.5 mg/kg）または生食をニュージランド白色種（2.1-2.4 kg、北山

ラベス)に投与し、1時間後LTA(Sigma)及びPepG(Fluka)160 μ g/mLを耳静脈より投与した。

LTA/PepG投与直前を0時間として、毎時間採血し白血球数を測定したところ、図25に示すように、生食投与群では白血球数の減少が観察されたのにに対して、F1024-1-3抗体投与群では白血球数の減少が観察されず、F1024-1-3抗体がLTA/PepGに由来する白血球減少症に対しても効果を示し、グラム陽性菌に由来する敗血症に対しても有効性が確認された。

(2) [F1024-1-3抗体の後投与効果]

(1) ①の方法にしたがって、LPS負荷ウサギ敗血症モデルを作製した。後投与群のプロトコールはF1024-1-3抗体を4、23時間毎に2.5mg/kgを耳静脈より投与し、コントロール群は抗体の変わりに生食を投与した。

まず、同様に群れ分けを行なったウサギ、各群5羽をより、-1時間に前採血を行なった。次に、プロトコールにしたがってLPSを投与し、さらに1、3、5、7、24、26、28、48時間毎に採血を行い、体重、白血球数、血清GPT値、血清クレアチニン値を同様に測定した。

まとめを、表5に示す。その結果、F1024-1-3抗体投与群では48時間後の生存率は100% (5/5) であったのに対して、生食投与群では80% (4/5) と有意な差が認められなかったが、28時間後の各種パラメータではF1024-1-3抗体投与群は正常値に近い値であり、一方、生食投与群は細胞が傷害されたことを示す異常値であった。また、図26に示すように血清中のクレアチニン値は経過観察中に大きな変動は認められず、F1024-1-3抗体

にLPS負荷により惹起される組織傷害を抑制する効果があることが確認された。

表5はF1024-1-3抗体のLPS負荷ウサギ敗血症モデルにおける後投与での各種パラメータの改善を示している。

表 5

	前値 (n=10) F1024-1-3抗体 投与群	生食投与群	
48時間後生存率 (%)	—	100%	80%
28時間後パラメータ			
白血球数 ($10^3/\text{mm}^3$)	6.6+/-0.4	5.3+/-0.7	1.6+/-0.3
GPT (U/L)	27+/-8	41+/-22	22+/-13
クレアチニン (mg/dL)	0.8+/-0.04	0.82+/-0.09	2.04+/-1.07
48時間後の体重 (kg)	2.13+/-0.08	1.98+/-0.1	1.92+/-0.06

(実施例24)

マウス致死性LPSショックモデルにおけるCD14改変体ポリペプチドの有効性

(1) [in vivo試験に用いるsCD14(1-356)及びsCD14(1-307)S286Cの調製]

sCD14(1-356)及びsCD14(1-307)S286Cを動物疾患モデルに投与して薬理作用を確認するために、sCD14(1-356)は実施例8に示す方法で1.15Lの培養上清から17.6mgを、sCD14(1-307)S286Cは実施例9に示す方法で7.8Lの培養上清から11.2mgをそれぞれ調製した。各ポリペプチドの純度は、銀染色法により単一バンドであることにより確認した。すなわち、各ポリペプチド100ng/1laneをSDS-polyacrylamide gradient gel(5-20%ATTオ社)で電気泳動し、2D-銀染色試薬・II「第一」キット(第一化学薬品社)を用いて蛋白の銀染色を行った。その結果、各ポリペプチドの計算上の大きさのバンドのみが染色された。

(2) [マウス致死性LPSショックモデルにおけるのsCD14(1-307)S286Cの効果]

生後6週齢のBalb/c雄性マウス(日本チャールズリバー社製)を、体重を元に5群(各群10匹)に群分けした。その後sCD14(1-307)S286Cを3mg/kgから10mg/kg、sCD14(1-356)を10mg/kg、生理食塩液(陰性対照用、大塚製薬)若しくはソル・メドロール10mg/kg(陽性対照用、ファルマシア・アップジョン社)を尾静脈より単回投

与した。

被験薬物投与の2分後に、LPS (*Salmonella minnesota Re 595*, SIGMA社) 10 μg/kg およびガラクトサミン (D-Galactosamine Hydrochloride, 和光純薬) 700 mg/kg を尾静脈より投与し、ショックを誘発した。その後24時間目まで経時に生存率を判定した。

その結果を図27に示す。陰性対照群である生理食塩液投与群ではショック誘発後8時間目までに全例死亡した。また、10mg/kgのsCD14 (1-356) を投与した群においてもショック誘発後12時間目までに全例死亡した。一方、sCD14 (1-307) S286C投与群では、10mg/kg投与群では24時間後でも8例生存し、3mg/kg投与群では6例の生存が確認された。この結果より、sCD14 (1-307) S286Cの用量依存的な生存率改善作用が確認された。

(実施例25)

CD14改変体ポリペプチドのN末端アミノ酸配列分析

CD14改変体ポリペプチドの一つであるsCD14 (1-307) S286CのN末端アミノ酸配列分析をProtein sequencer Processor™ 494cLC Protein sequencing system (Applied Biosystems Japan株式会社) を用いて実施した。その結果、N末端アミノ酸配列としてThr Thr Pro Glu Proの5残基のみが確認された。他のアミノ酸配列が確認されなかった事

から、sCD14(1-307)S286CのN末端は、1番目のアミノ酸である事がわかった。

(実施例26)

大腸菌を用いたsCD14(1-285)の発現

実施例8-(2)で作製したsCD14(1-285)発現プラスミドpM1659よりNcoI及びHindIIIを用いてCD14のコーディング領域を切り出した。次にこのDNA断片を、Trpプロモーターを持つ大腸菌発現用プラスミドpTrc99A(アマシャムファルマシアバイオテック社)のNcoI及びHindIIIにて挿入し、定法に従ってJM109コンピテントセルをtransformationし、プラスミドpTrc1659を得た。得られたプラスミドを鋳型にセンスプライマー27(配列番号72)及びアンチセンスプライマー-35(配列番号73)を用いてPyrobest DNA Polymerase(TaKaRa社)により98℃で10秒、55℃で30秒、72℃で1分のサイクルを30回繰り返しPCR反応を行った。次にこのPCR産物をXhoIで消化した。また、pTrc1659をNcoIで消化し、Klenow fragment(TaKaRa社)により末端の平滑化を行った後にXhoIにて消化し、前述のPCR産物をligationした。定法に従ってJM109コンピテントセルをtransformationし、sCD14(1-285)大腸菌発現プラスミドpTrc1659-2を得た。pTrc1659-2を含むJM109は、終濃度50μg/mLのアンピシリン(D[-]-α-Amnobenzylpenicillin; Sigma社)を含むLB培地(B

IO 101社) にて600 nmの吸光度が1になるまで培養し、終濃度1 mM のIPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside; Sigma社) を培地中に添加してさらに3時間培養した。遠心分離法にて回収した菌体を0.5% Triton-X100 (Sigma社) を含むTEバッファー(和光純薬)に懸濁して凍結融解および超音波処理にて菌体を破壊後、CD14ポリペプチドを可溶化した。ポリペプチドの発現量を実施例8-(5)に示す方法にて測定したところ、大腸菌培養液1mL当たり約8 μ g/mLの発現量が得られた。

産業上の利用可能性

本発明によれば、すでに形成されたCD14/LPSであっても細胞内へのシグナル伝達を調節しうるCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有する物質、その作成方法、敗血症治療薬のスクリーニング方法、敗血症用医薬組成物を提供される。

請求の範囲

1. 配列番号1に記載のヒトCD14の269番から315番までの領域の一部を含むエピトープを特異的に認識し、CD14とToll Like Receptor (以下TLRという)との結合を阻害する機能を有する抗CD14抗体。
- (1) 2. モノクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。
3. 請求項2に記載の抗体のFab、Fab'または(Fab')₂である断片。
4. ハイブリドーマF1024-1-3(受託番号P-18061)により產生されるF1024-1-3モノクローナル抗体。
5. 請求項2~4のいずれかに記載の抗体若しくは抗体の断片を產生するハイブリドーマ。
- (2) 6. 配列番号1に記載のヒトCD14の269番から315番までの領域のアミノ酸を連続8個以上含むペプチド。
7. 請求項6に記載のペプチドを免疫原として用いる抗体の作成方法。
8. CD14とTLRとの結合を阻害する機能を有し、以下①または②のいずれかであるCD14改変体ポリペプチド：
 - ①配列番号1に記載のアミノ酸配列のN末端が1~6番目のいずれかであり、C末端が246~306番目のいずれかのアミノ酸配列を有する、
 - ②配列番号1に記載のアミノ酸配列のN末端が1~6番目のいずれかであり、C末端が269~356番目のいずれかであり、かつ269~307番目のアミ

ノ酸のいずれか一つ以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する。

9. 請求項8の①において、C末端が246～285番目のいずれかである請求項8に記載のCD14改変体ポリペプチド。

10. 請求項8の②において、C末端が269～356番目のいずれかであり、かつ269～307番目のアミノ酸のいずれか一つ以上がLeu、Ala、CysまたはGlyに置換された請求項8に記載のCD14改変体ポリペプチド。

11. 請求項8～10のいずれかに記載のCD14改変体ポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有するCD14改変体ポリペプチド

12. 請求項8～11のいずれかに記載のCD14改変体ポリペプチドをコードする遺伝子。

13. 以下の①または②のDNAからなる遺伝子。

①配列番号4～6のいずれかに記載のDNA

②配列番号4～6のいずれかに記載のDNAとストリンジエントな条件下ハイブリダイズし、かつCD14とTLRとの結合を阻害する機能を有するポリペプチドをコードするDNA

14. 請求項12または13に記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

15. 請求項14に記載の組換えベクターを含有する形質転換体。

16. 請求項15に記載の形質転換体を培養する工程を含むことを特徴とする請求項8～11のいずれかに記載のCD14改変体ポリペプチドの製造方法。

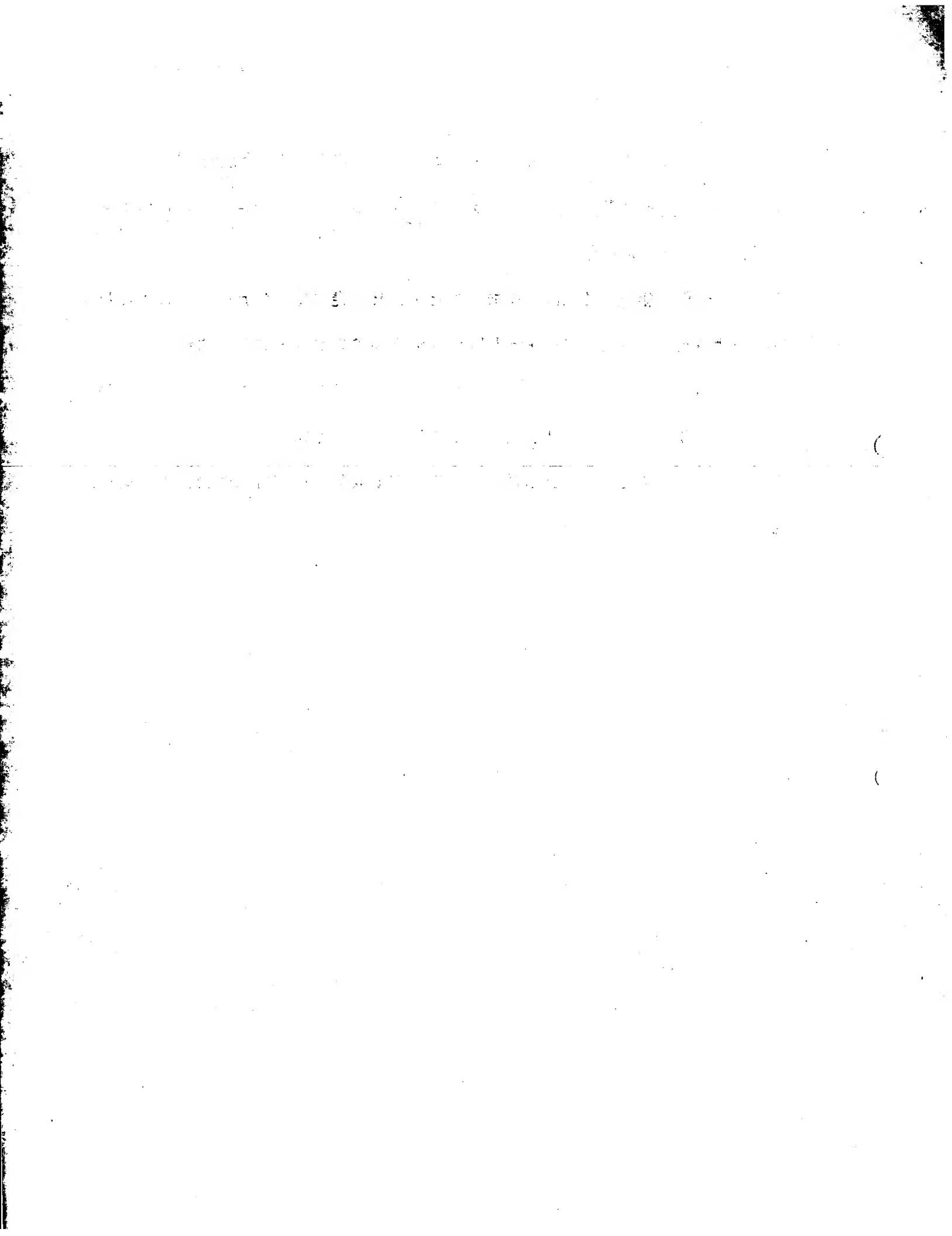
17. 血漿から得られる分子量 36 ± 5 kDaのCD14低分子種。

18. 抗体、抗体断片、ポリペプチドまたはCD14低分子種を含むCD14とTLRとの結合阻害剤。

19. 遺伝子組換え法により作成されたTLRを発現する細胞に、CD14及び被検物質を接触させる工程を含む敗血症治療薬のスクリーニング方法。

20. 請求項18または19のいずれかに記載のスクリーニング方法で得られた抗CD14抗体、CD14改変体若しくは低分子化合物。

21. CD14とTLRとの結合阻害剤を有効成分として含む敗血症用医薬組成物。



1 / 4 4

配 列 表

<110> MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Anti-CD14 antibody

<130> MD0580

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 356

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val

1 5 10 15

Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys

20 25 30

Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu

35 40 45

Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala

(

(

2 / 4 4

50 55 60
Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala
65 70 75 80
Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu Ala Tyr
85 90 95
Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr Gly Thr
100 105 110
(
Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser Ser Leu
115 120 125
Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu
130 135 140
Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln
145 150 155 160
Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala
165 170 175
(
Leu Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly
180 185 190
Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu
195 200 205
Ala Leu Arg Asn Thr Gly Met Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala
210 215 220
Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn

(

(

3 / 4 4

225 230 235 240

Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser

245 250 255

Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val

260 265 270

Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Cys Asn

275 280 285

(Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn

290 295 300

Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala Leu Pro

305 310 315 320

His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala Arg Ser

325 330 335

Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln Gly Ala

(340 345 350

Arg Gly Phe Ala

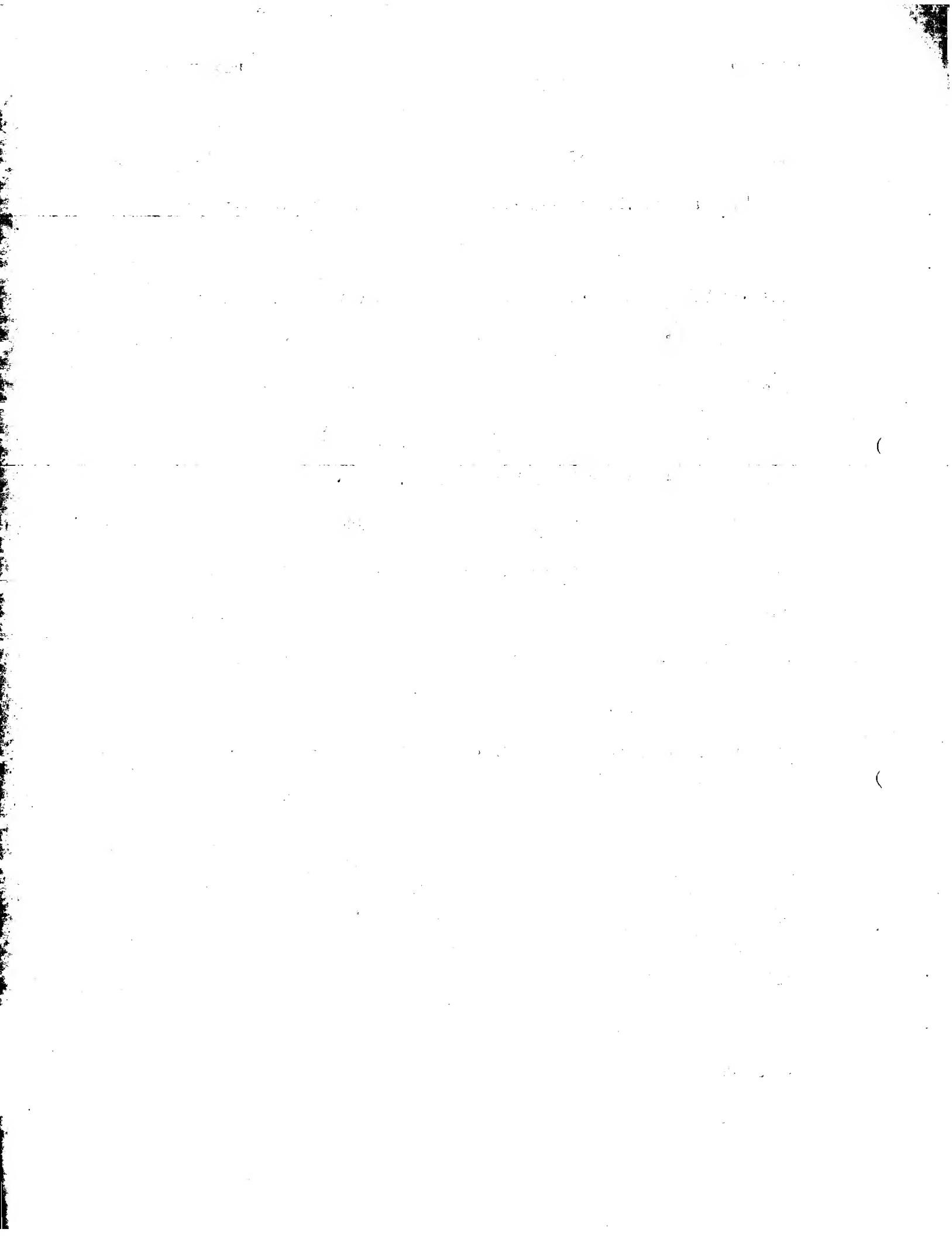
355

<210> 2

<211> 47

<212> PRT

<213> human



4 / 4 4

<400> 2

Leu Glu Gln Val Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp

1

5

10

15

Leu Ser Cys Asn Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro

20

25

30

Glu Val Asp Asn Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro

35

40

45

<210> 3

<211> 1360

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (117)..(1244)

<400> 3

gtcgacgagt tcacaagtgt gaagcctgtga agccggcggg tgccgcgtgt taggaaagaa 60

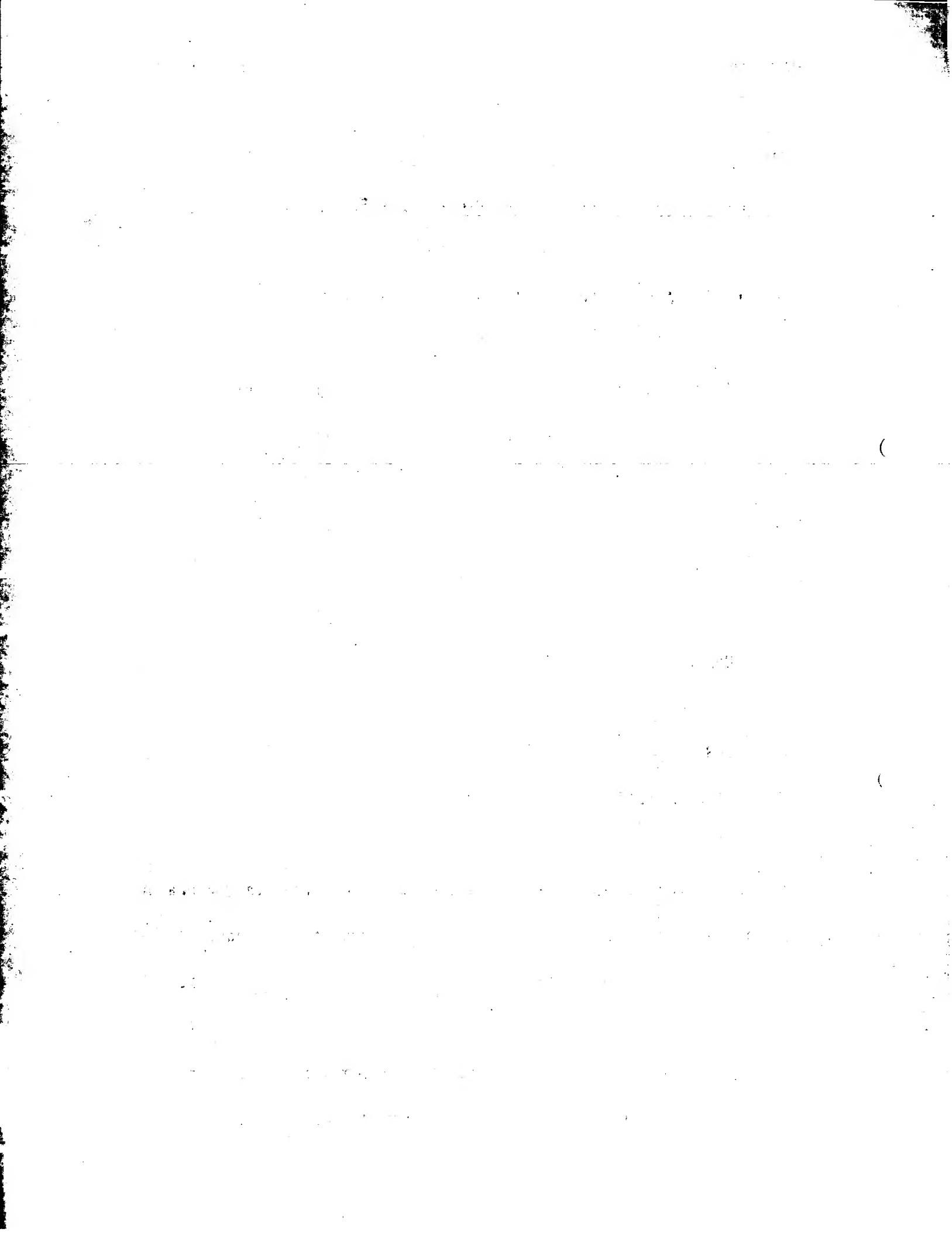
gctaaaggcac ttcagagacc tgcggagtc tcaagggttc ggaagactta tcgacc atg 119

Met

1

gag cgc gcg tcc tgc ttg ctg ctg ctg ccg ctg gtg cac gtc 167

Glu Arg Ala Ser Cys Leu Leu Leu Leu Pro Leu Val His Val



5 / 44

5

10

15

tct gcg acc acg cca gaa cct tgt gag ctg gac gat gaa gat ttc cgc 215

Ser Ala Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg

20

25

30

tgt gtc tgc aac ttc tcc gaa cct cag ccc gac tgg tcc gaa gcc ttc 263

Cys Val Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe

35

40

45

(c) cag tgt gtg tct gca gta gag gtg gag atc cat gcc ggc ggt ctc aac 311

Gln Cys Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn

50

55

60

65

cta gag ccg ttt cta aag cgc gtc gat gcg gac gcc gac ccg cgg cag 359

Leu Glu Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln

70

75

80

(Tyr gct gac acg gtc aag gct ctc cgc gtg cgg cgg ctc aca gtg gga 407

(Tyr Ala Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly

85

90

95

(gcc gca cag gtt cct gct cag cta ctg gta ggc gcc ctg cgt gtg cta 455

Ala Ala Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu

100

105

110

(gcg tac tcc cgc ctc aag gaa ctg acg ctc gag gac cta aag ata acc 503

Ala Tyr Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr

115

120

125

(

{

6 / 44

ggc acc atg cct ccg ctg cct ctg gaa gcc aca gga ctt gca ctt tcc 551

Gly Thr Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser

130 135 140 145

agc ttg cgc cta cgc aac gtg tcg tgg gcg aca ggg cgt tct tgg ctc 599

Ser Leu Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu

150 155 160

(gcc gag ctg cag cag tgg ctc aag cca ggc ctc aag gta ctg agc att 647

Ala Glu Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile

165 170 175

gcc caa gca cac tcg cct gcc ttt tcc tgc gaa cag gtt cgc gcc ttc 695

Ala Gln Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe

180 185 190

ccg gcc ctt acc agc cta gac ctg tct gac aat cct gga ctg ggc gaa 743

Pro Ala Leu Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu

(195 200 205

cgc gga ctg atg gcg gct ctc tgt ccc cac aag ttc ccg gcc atc cag 791

Arg Gly Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln

210 215 220 225

aat cta gcg ctg cgc aac aca gga atg gag acg ccc aca ggc gtg tgc 839

Asn Leu Ala Leu Arg Asn Thr Gly Met Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys

230 235 240

gcc gca ctg gcg gca ggt gtg cag ccc cac agc cta gac ctc agc 887

(

(

7 / 4 4

Ala Ala Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser
245 250 255
cac aac tcg ctg cgc gcc acc gta aac cct agc gct ccg aga tgc atg 935
His Asn Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met
260 265 270
tgg tcc agc gcc ctg aac tcc ctc aat ctg tcg ttc gct ggg ctg gaa 983
Trp Ser Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu
275 280 285
cag gtg cct aaa gga ctg cca gcc aag ctc aga gtg ctc gat ctc agc 1031
Gln Val Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser
290 295 300 305
tgc aac aga ctg aac agg gcg ccg cag cct gac gag ctg ccc gag gtg 1079
Cys Asn Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val
310 315 320
gat aac ctg aca ctg gac ggg aat ccc ttc ctg gtc cct gga act gcc 1127
Asp Asn Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly Thr Ala
325 330 335
ctc ccc cac gag ggc tca atg aac tcc ggc gtg gtc cca gcc tgt gca 1175
Leu Pro His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly Val Val Pro Ala Cys Ala
340 345 350
cgt tcg acc ctg tcg gtg ggg gtg tcg gga acc ctg gtg ctg ctc caa 1223
Arg Ser Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr Leu Val Leu Leu Gln

(

(

8 / 4 4

355

360

365

ggg gcc cgg ggc ttt gcc taa gatccaagac agaataatga atggactcaa 1274

Gly Ala Arg Gly Phe Ala

370

375

actgccttgg cttagggga gtcccgtag gacgttgagg acttttcgac caattcaacc 1334

ctttccccca cccttattaa gcatgc 1360

(

<210> 4

<211> 855

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ACC ACG CCA GAA CCT TGT GAG CTG GAC GAT GAA GAT TTC CGC TGC GTC 48

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val

1

5

10

15

TGC AAC TTC TCC GAA CCT CAG CCC GAC TGG TCC GAA GCC TTC CAG TGT 96

Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys

20

25

30

GTG TCT GCA GTA GAG GTG GAG ATC CAT GCC GGC GGT CTC AAC CTA GAG 144

Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu

35

40

45

CCG TTT CTA AAG CGC GTC CAT GCG GAC GCC GAC CCG CGG CAG TAT GCT 192

(

(

9 / 4 4

Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala
50 55 60
GAC ACG GTC AAG GCT CTC CGC GTG CGG CGG CTC ACA GTG GGA GCC GCA 240
Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala
65 70 75 80
CAG GTT CCT GCT CAG CTA CTG GTA GGC GCC CTG CGT GTG CTA GCG TAC 288
Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu Ala Tyr
85 90 95
TCC CGC CTC AAG GAA CTG ACG CTC GAG GAC CTA AAG ATA ACC GGC ACC 336
Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr Gly Thr
100 105 110
ATG CCT CCG CTG CCT CTG GAA GCC ACA GGA CTT GCA CTT TCC AGC TTG 384
Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser Ser Leu
115 120 125
CGC CTA CGC AAC GTG TCG TGG GCG ACA GGG CGT TCT TGG CTC GCC GAG 432
Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu
130 135 140
CTG CAG CAG TGG CTC AAG CCA GGC CTC AAG GTA CTG AGC ATT GCC CAA 480
Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln
145 150 155 160
GCA CAC TCG CCT GCC TTT TCC TGC GAA CAG GTT CGC GCC TTC CCG GCC 528
Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala

(

)

1 0 / 4 4

165

170

175

CTT ACC AGC CTA GAC CTG TCT GAC AAT CCT GGA CTG GGC GAA CGC GGA 576

Leu Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly

180

185

190

CTG ATG GCG GCT CTC TGT CCC CAC AAG TTC CCG GCC ATC CAG AAT CTA 624

Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu

195

200

205

GCG CTG CGC AAC ACA GGA ATG GAG ACG CCC ACA GGC GTG TGC GCC GCA 672

Ala Leu Arg Asn Thr Gly Met Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala

210

215

220

CTG GCG GCG GCA GGT GTG CAG CCC CAC AGC CTA GAC CTC AGC CAC AAC 720

Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn

225

230

235

240

TCG CTG CGC GCC ACC GTA AAC CCT AGC GCT CCG AGA TGC ATG TGG TCC 768

Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser

245

250

255

AGC GCC CTG AAC TCC CTC AAT CTG TCG TTC GCT GGG CTG GAA CAG GTG 816

Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val

260

265

270

CCT AAA GGA CTG CCA GCC AAG CTC AGA GTG CTC GAT CTC 855

Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu

275

280

285

(

)

1 1 / 4 4

<210> 5

<211> 921

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ACC ACG CCA GAA CCT TGT GAG CTG GAC GAT GAA GAT TTC CGC TGC GTC 48

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val

1 5 10 15

TGC AAC TTC TCC GAA CCT CAG CCC GAC TGG TCC GAA GCC TTC CAG TGT 96

Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys

20 25 30

GTG TCT GCA GTA GAG GTG GAG ATC CAT GCC GGC GGT CTC AAC CTA GAG 144

Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu

35 40 45

CCG TTT CTA AAG CGC GTC GAT GCG GAC GCC GAC CCG CGG CAG TAT GCT 192

Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala

50 55 60

GAC ACG GTC AAG GCT CTC CGC GTG CGG CGG CTC ACA GTG GGA GCC GCA 240

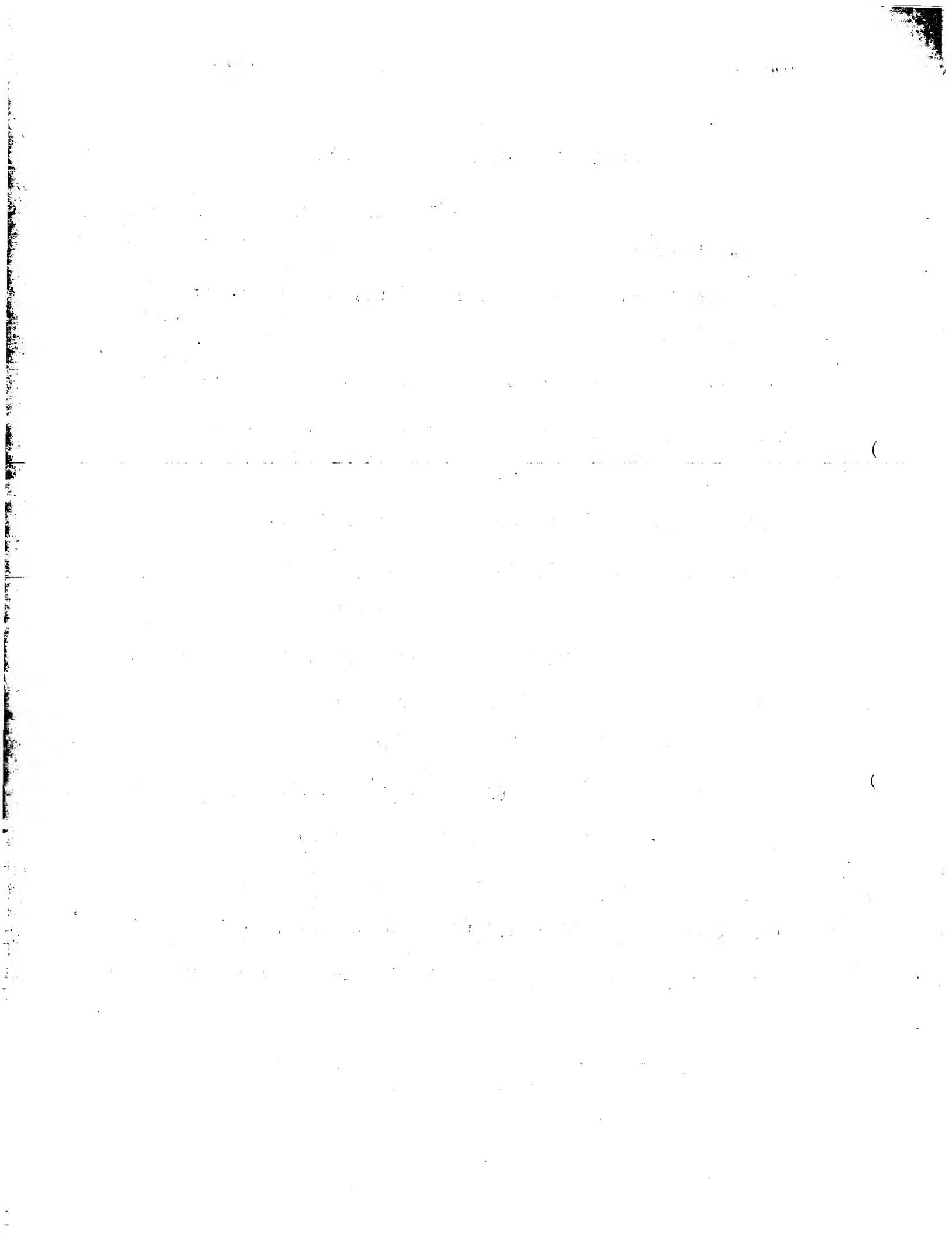
Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala

65 70 75 80

CAG GTT CCT GCT CAG CTA CTG GTC GGC GCC CTG CGT GTG CTA GCG TAC 288

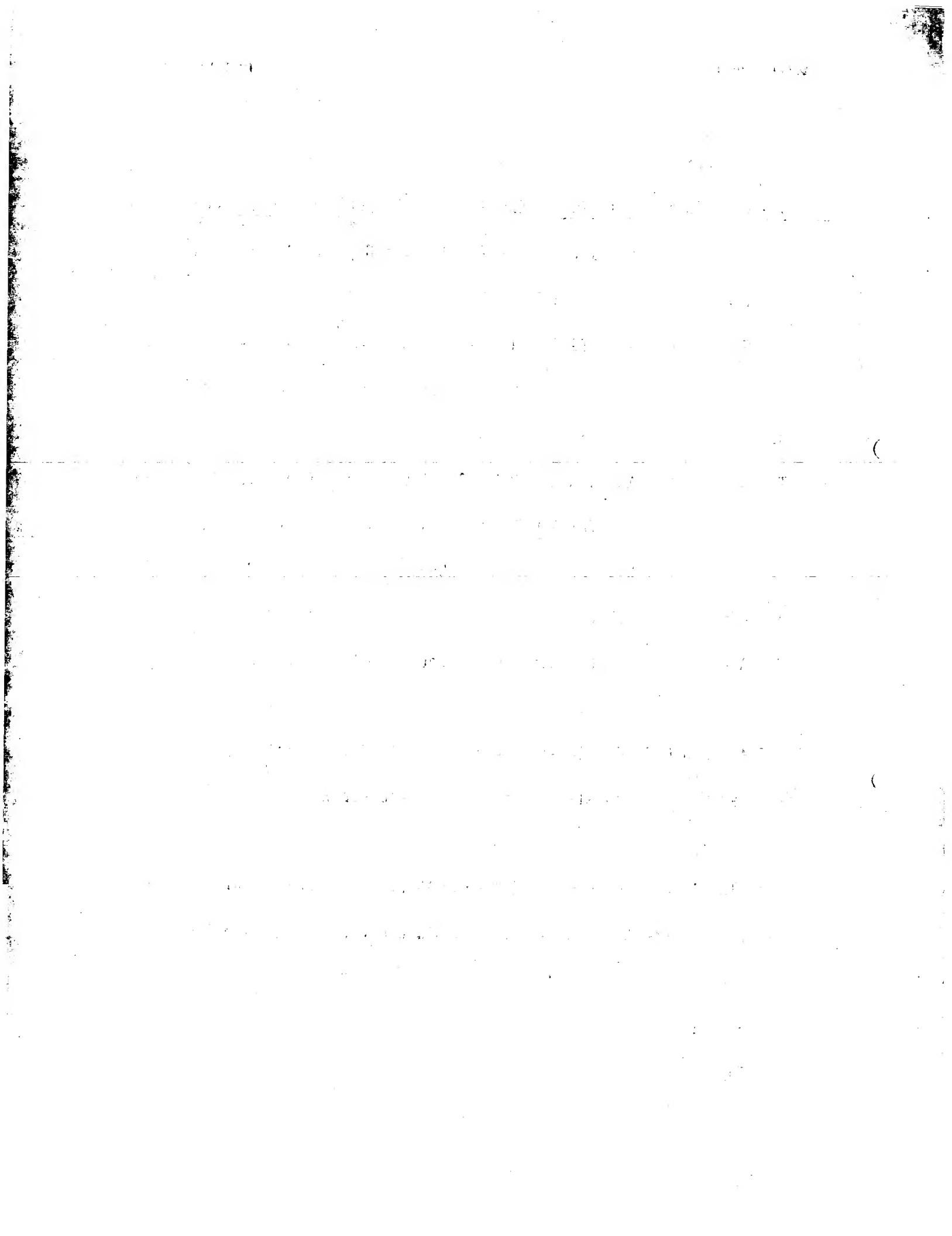
1 2 / 4 4

Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu Ala Tyr
85 90 95
TCC CGC CTC AAG GAA CTG ACG CTC GAG GAC CTA AAG ATA ACC GGC ACC 336
Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr Gly Thr
100 105 110
ATG CCT CCG CTG CCT CTG GAA GCC ACA GGA CTT GCA CTT TCC AGC TTG 384
Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser Ser Leu
115 120 125
CGC CTA CGC AAC GTG TCG TGG GCG ACA GGG CGT TCT TGG CTC GCC GAG 432
Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu
130 135 140
CTG CAG CAG TGG CTC AAG CCA GCC CTC AAG GTC AGC ATT GCC CAA 480
Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln
145 150 155 160
GCA CAC TCG CCT GCC TTT TCC TGC GAA CAG GTT CGC GCC TTC CCG GCC 528
Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala
165 170 175
CTT ACC AGC CTA GAC CTG TCT GAC AAT CCT GGA CTG GGC GAA CGC GGA 576
Leu Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly
180 185 190
CTG ATG GCG GCT CTC TGT CCC CAC AAG TTC CCG GCC ATC CAG AAT CTA 624
Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu



1 3 / 4 4

195 200 205
GCG CTG CGC AAC ACA GGA ATG GAG ACG CCC ACA GGC GTG TGC GCC GCA 672
Ala Leu Arg Asn Thr Gly Met Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala
210 215 220
CTG GCG GCG GCA GGT GTG CAG CCC CAC AGC CTA GAC CTC AGC CAC AAC 720
Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn
225 230 235 240
TCG CTG CGC GCC ACC GTA AAC CCT AGC GCT CCG AGA TGC ATG TGG TCC 768
Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser
245 250 255
AGC GCC CTG AAC TCC CTC AAT CTG TCG TTC GCT GGG CTG GAA CAG GTG 816
Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val
260 265 270
CCT AAA GGA CTG CCA GCC AAG CTC AGA GTG CTC GAT CTC GCT TGC AAC 864
Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Ala Cys Asn
275 280 285
AGA CTG AAC AGG GCG CCG CAG CCT GAC GAG CTG CCC GAG GTG GAT AAC 912
Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn
290 295 300
CTG ACA CTG 921
Leu Thr Leu



1 4 / 4 4

<210> 6

<211> 921

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ACC ACG CCA GAA CCT TGT GAG CTG GAC GAT GAA GAT TTC CGC TGC GTC 48

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val

1

5

10

15

TGC AAC TTC TCC GAA CCT CAG CCC GAC TGG TCC GAA GCC TTC CAG TGT 96

Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys

20

25

30

GTG TCT GCA GTA GAG GTG GAG ATC CAT GCC GGC GGT CTC AAC CTA GAG 144

Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu

35

40

45

CCG TTT CTA AAG CGC GTC GAT GCG GAC GCC GAC CCG CGG CAG TAT GCT 192

Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala

50

55

60

GAC ACG GTC AAG GCT CTC CGC GTG CGG CGG CTC ACA GTG GGA GCC GCA 240

Asp Thr Val Lys Ala Leu Arg Val Arg Arg Leu Thr Val Gly Ala Ala

65

70

75

80

CAG GTT CCT GCT CAG CTA CTG GTA GGC GCC CTG CGT GTG CTA GCG TAC 288

Gln Val Pro Ala Gln Leu Leu Val Gly Ala Leu Arg Val Leu Ala Tyr

(

{

15 / 44

85

90

95

TCC CGC CTC AAG GAA CTG ACG CTC GAG GAC CTA AAG ATA ACC GGC ACC 336

Ser Arg Leu Lys Glu Leu Thr Leu Glu Asp Leu Lys Ile Thr Gly Thr

100

105

110

ATG CCT CCG CTG CCT CTG GAA GCC ACA GGA CTT GCA CTT TCC AGC TTG 384

Met Pro Pro Leu Pro Leu Glu Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser Ser Leu

115

120

125

CGC CTA CGC AAC GTG TCG TGG GCG ACA GGG CGT TCT TGG CTC GCC GAG 432

Arg Leu Arg Asn Val Ser Trp Ala Thr Gly Arg Ser Trp Leu Ala Glu

130

135

140

CTG CAG CAG TGG CTC AAG CCA GGC CTC AAG GTA CTG AGC ATT GCC CAA 480

Leu Gln Gln Trp Leu Lys Pro Gly Leu Lys Val Leu Ser Ile Ala Gln

145

150

155

160

GCA CAC TCG CCT GCC TTT TCC TGC GAA CAG GTT CGC GCC TTC CCG GCC 528

Ala His Ser Pro Ala Phe Ser Cys Glu Gln Val Arg Ala Phe Pro Ala

165

170

175

CTT ACC AGC CTA GAC CTG TCT GAC AAT CCT GGA CTG GGC GAA CGC GGA 576

Leu Thr Ser Leu Asp Leu Ser Asp Asn Pro Gly Leu Gly Glu Arg Gly

180

185

190

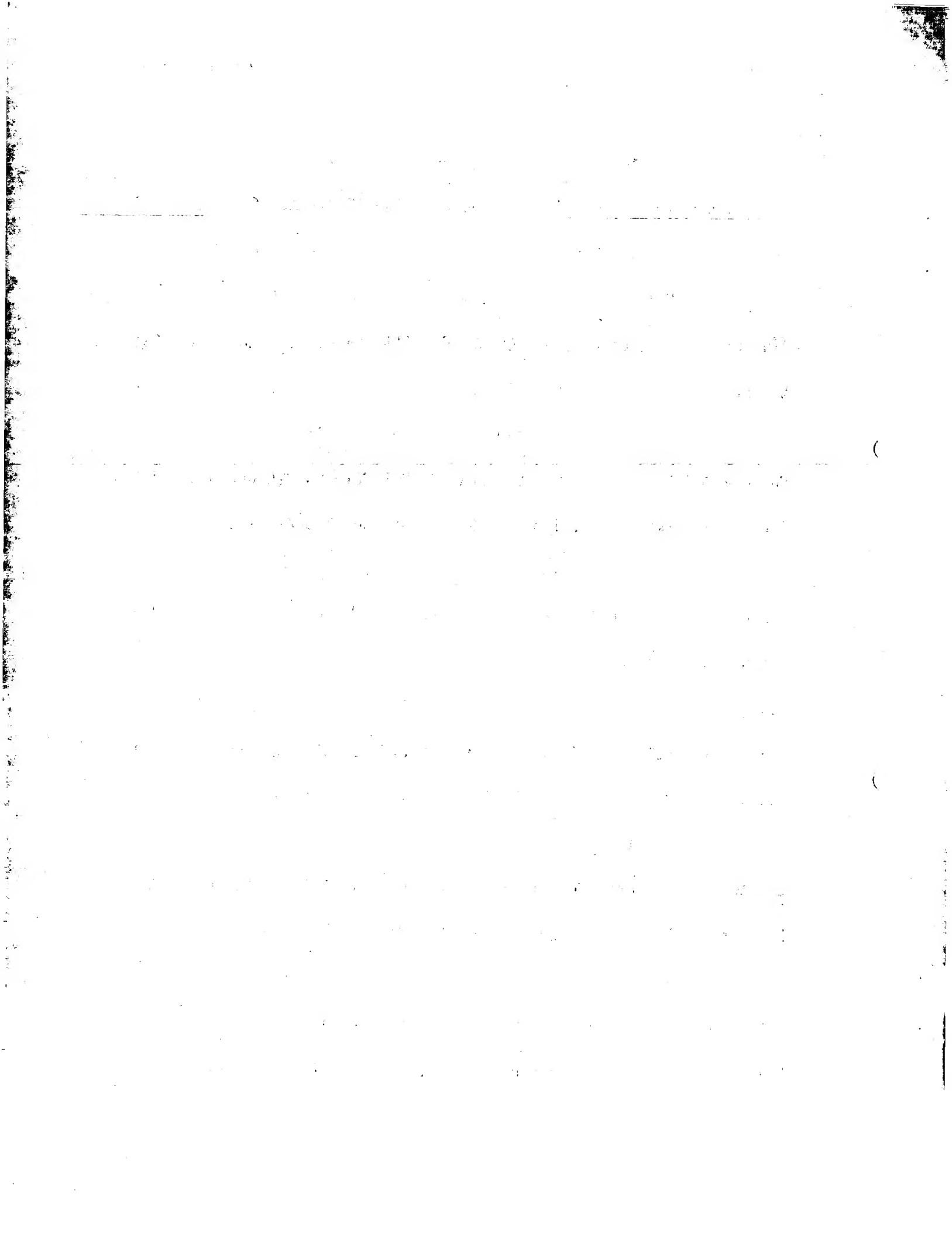
CTG ATG GCG GCT CTC TGT CCC CAC AAG TTC CCG GCC ATC CAG AAT CTA 624

Leu Met Ala Ala Leu Cys Pro His Lys Phe Pro Ala Ile Gln Asn Leu

195

200

205



1 6 / 4 4

GCG CTG CGC AAC ACA GGA ATG GAG ACG CCC ACA GGC GTG TGC GCC GCA 672

Ala Leu Arg Asn Thr Gly Met Glu Thr Pro Thr Gly Val Cys Ala Ala

210

215

220

CTG GCG GCG GCA GGT GTG CAG CCC CAC AGC CTA GAC CTC AGC CAC AAC 720

Leu Ala Ala Ala Gly Val Gln Pro His Ser Leu Asp Leu Ser His Asn

225

230

235

240

TCG CTG CGC GCC ACC GTA AAC CCT AGC GCT CCG AGA TGC ATG TGG TCC 768

Ser Leu Arg Ala Thr Val Asn Pro Ser Ala Pro Arg Cys Met Trp Ser

245

250

255

AGC GCC CTG AAC TCC CTC AAT CTG TCG TTC GCT GGG CTG GAA CAG GTG 816

Ser Ala Leu Asn Ser Leu Asn Leu Ser Phe Ala Gly Leu Glu Gln Val

260

265

270

CCT AAA GGA CTG CCA GCC AAG CTC AGA GTG CTC GAT CTC TGT TGC AAC 864

Pro Lys Gly Leu Pro Ala Lys Leu Arg Val Leu Asp Leu Cys Cys Asn

275

280

285

AGA CTG AAC AGG GCG CCG CAG CCT GAC GAG CTG CCC GAG GTG GAT AAC 912

Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu Leu Pro Glu Val Asp Asn

290

295

300

CTG ACA CTG 921

Leu Thr Leu

305

(

(

1 7 / 4 4

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 1

<400> 7

tcgaggaaga gaagacacca

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 2

<400> 8

cccatccaga gtttagccct

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

(

V

1 8 / 4 4

<220>

<221> antisense primer 1

<400> 9

ccatccgaaa ttataagaaa agtc

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 2

<400> 10

cccaaggctt ggaattactc acccttagc

<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> human

<400> 11

Leu Asp Leu Ser Cys Asn Arg Leu Asn Arg Ala Pro Gln Pro Asp Glu

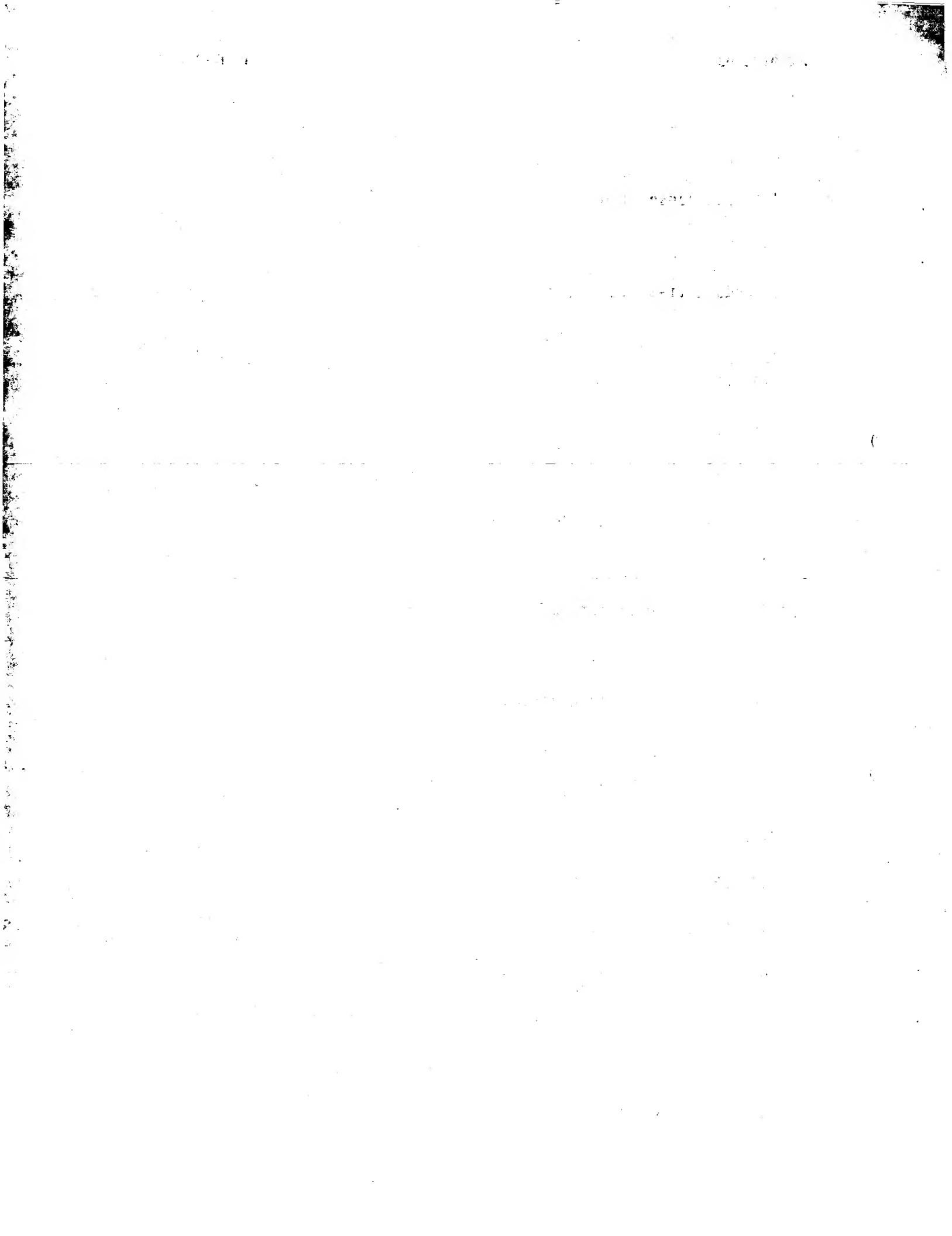
1

5

10

15

Leu Pro Glu Val Asp Asn Leu Thr



1 9 / 4 4

20

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> human

<400> 12

Glu Val Asp Asn Leu Thr Leu Asp Gly Asn Pro Phe Leu Val Pro Gly

1

5

10

15

Thr Ala

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> human

<400> 13

Thr Ala Leu Pro His Glu Gly Ser Met Asn Ser Gly

1

5

10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

2 0 / 4 4

<213> human

<400> 14

Pro Ala Cys Ala Arg Ser Thr Leu Ser Val Gly Val Ser Gly Thr

1

5

10

15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 15

Gln Gly Pro Cys Arg Ala Phe Ile Lys Leu Trp Ala Phe Asp Cys

1

5

10

15

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 3

<400> 16

ctctggctaa ctagagaacc

2 1 / 4 4

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 3

<400> 17

(gcggaaatca caaggttctg g

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 4

<400> 18

gaaccttggc atttccgcgtg c

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2 2 / 4 4

<220>

<221> antisense primer 4

<400> 19

ttatttaggaa aggacagtggtt

<210> 20

<211> 30

(

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 5

<400> 20

agccttgacc gtgtccgcat cgacgcgtt

(

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 5

<400> 21

aagcgcgicg atgccccacac ggtcaaggct

{

<210> 22

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 6

<400> 22

gttgtgagac aggtctaggc tggtaagggc cgggaaggc

<210> 23

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 6

<400> 23

gcccttacca gccttagacct gtctcacaac tcgctgcgc

<210> 24

<211> 39

<212> DNA

2 4 / 4 4

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 7

<400> 24

cagtctgttg caagacaggt ctaggctgtg gggctgcac

<210> 25

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 7

<400> 25

cacagcctag acctgtcttg caacagactg aacagggcg

<210> 26

<211> 39

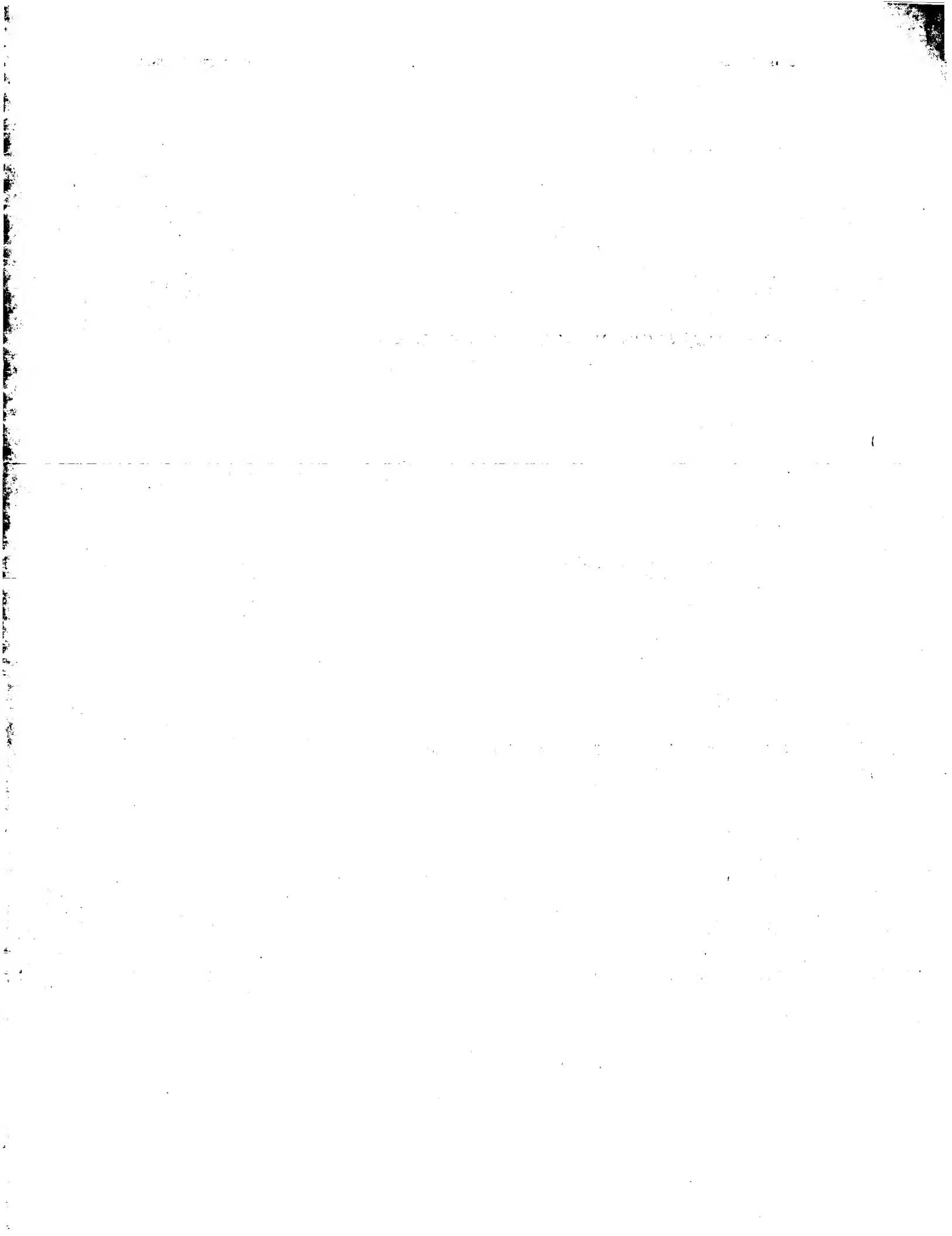
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 8

<400> 26



25 / 44

cagtcgttgc caagacaggt ctaggctggtaagggccgg

<210> 27

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 8

<400> 27

accagccttag acctgtcttg caacagactg aacaggcg

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 9

<400> 28

cacgccagaa ccttgtgagc

<210> 29

<211> 38

(

2 6 / 4 4

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 9

<400> 29

gtcagtgcac aggctggac cacaacggat tgcattga

(

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 10

<400> 30

(

cccaagcttc tattacagtg tcaggttatc

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 11

27 / 44

<400> 31

cccaagcttc tattaggcga gctcgtaagg

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

(

<220>

<221> antisense primer 12

<400> 32

cccaagcttc tattactgcg gcgcctgtt

<210> 33

<211> 30

(

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

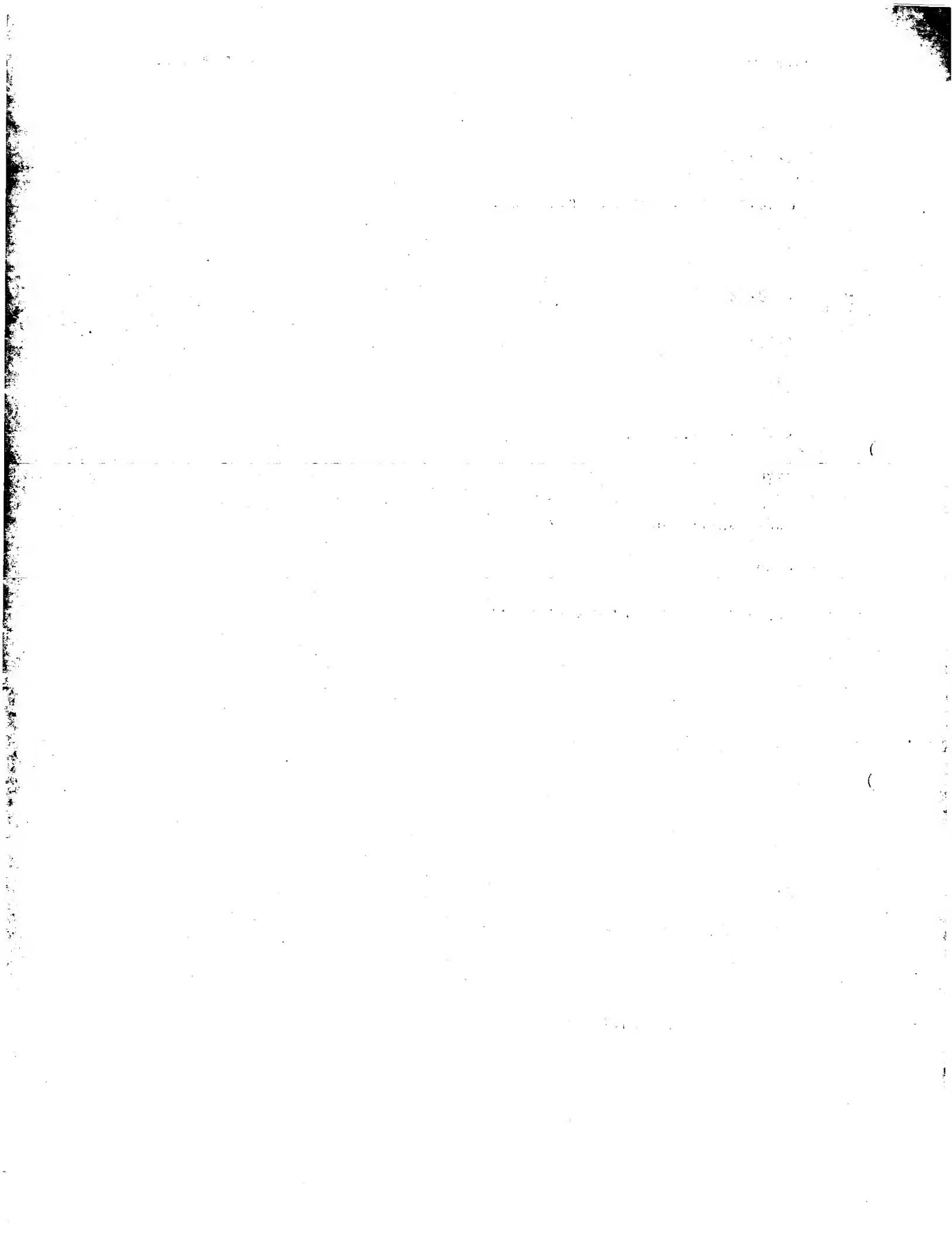
<220>

<221> antisense primer 13

<400> 33

cccaagcttc tattacagtc ttttgagct

<210> 34



2 8 / 4 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 14

<400> 34

cccaagcttc tattagagat cgagcactct

(

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 15

(

<400> 35

cccaagcttc tattatacgg tggcgcgcag

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

{

2 9 / 4 4

<221> antisense primer 16

<400> 36

cccaagcttc tattaagaca ggtaggct

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 17

<400> 37

cccaagcttc tattagcctg gcttgagcca

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

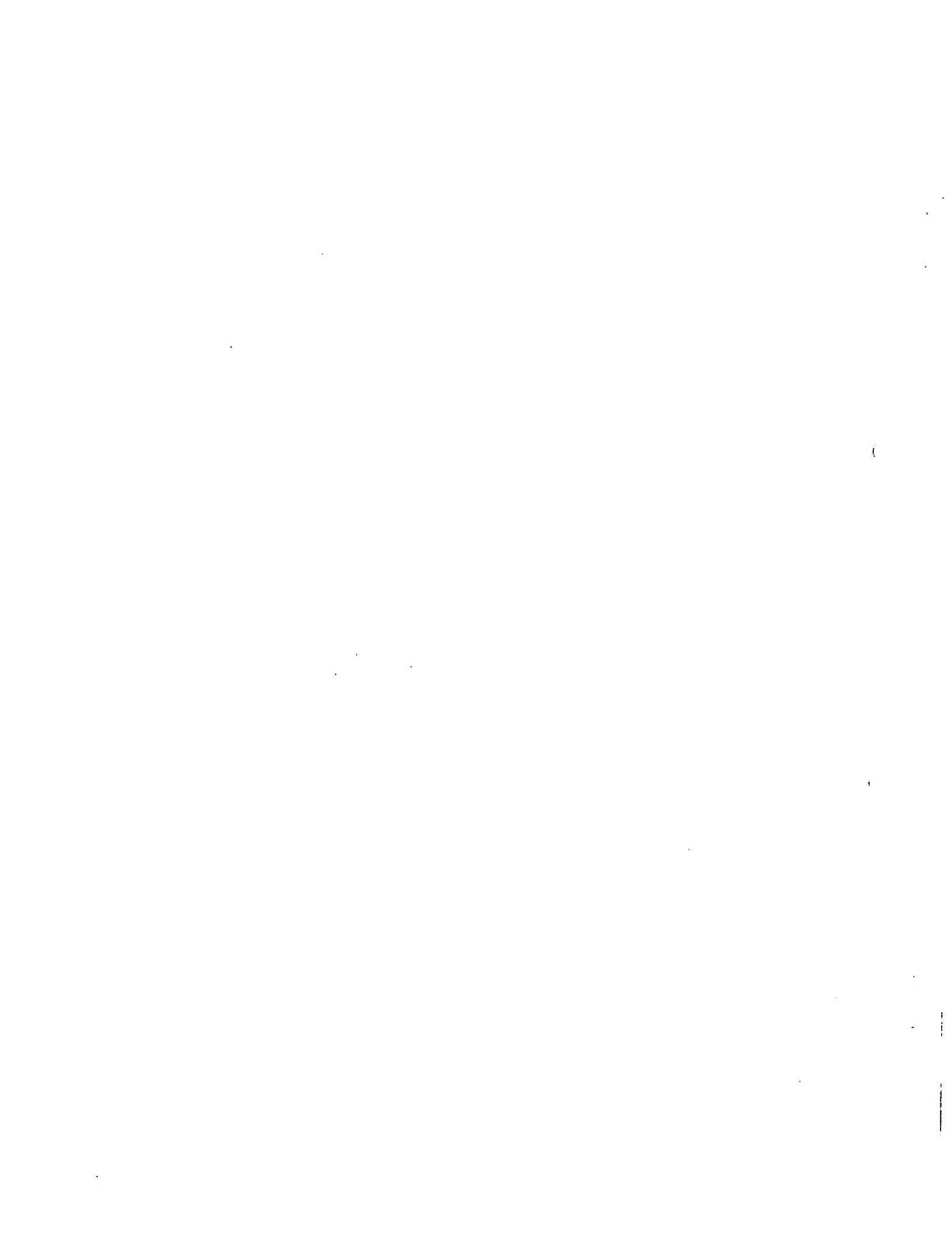
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 18

<400> 38

actctgagag cggctggcag tcc



3 0 / 4 4

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 10

<400> 39

(tgccagccgc tctcagatg ctc

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

(<221> antisense primer 19

<400> 40

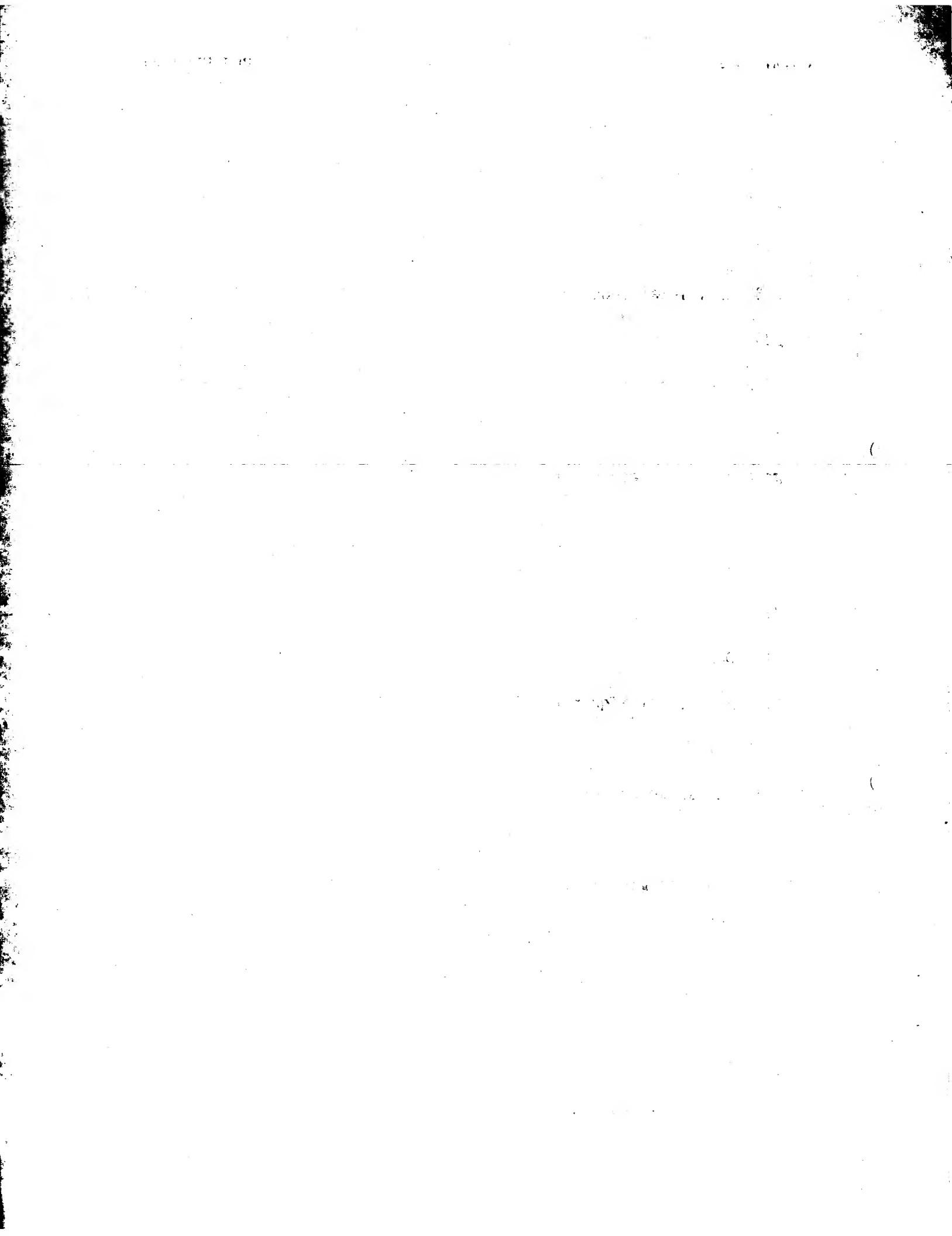
agatcgagag ctctgagctt ggc

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



3 1 / 4 4

<220>

<221> antisense primer 20

<400> 41

gagatcagcc actctgagct

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 21

<400> 42

gctgagagcg agcactctga

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 22

<400> 43

gcagctagca tcgaggcactc

3 2 / 4 4

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 23

<400> 44

gttgcaagcg agatcgagca

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 24

<400> 45

tctgttagcg ctgagatcga

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

(

{

3 3 / 4 4

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 25

<400> 46

gttcagagcg tgcagctga

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 26

<400> 47

tcaaggctgcg ccgccctgtt c

<210> 48

<211> 21

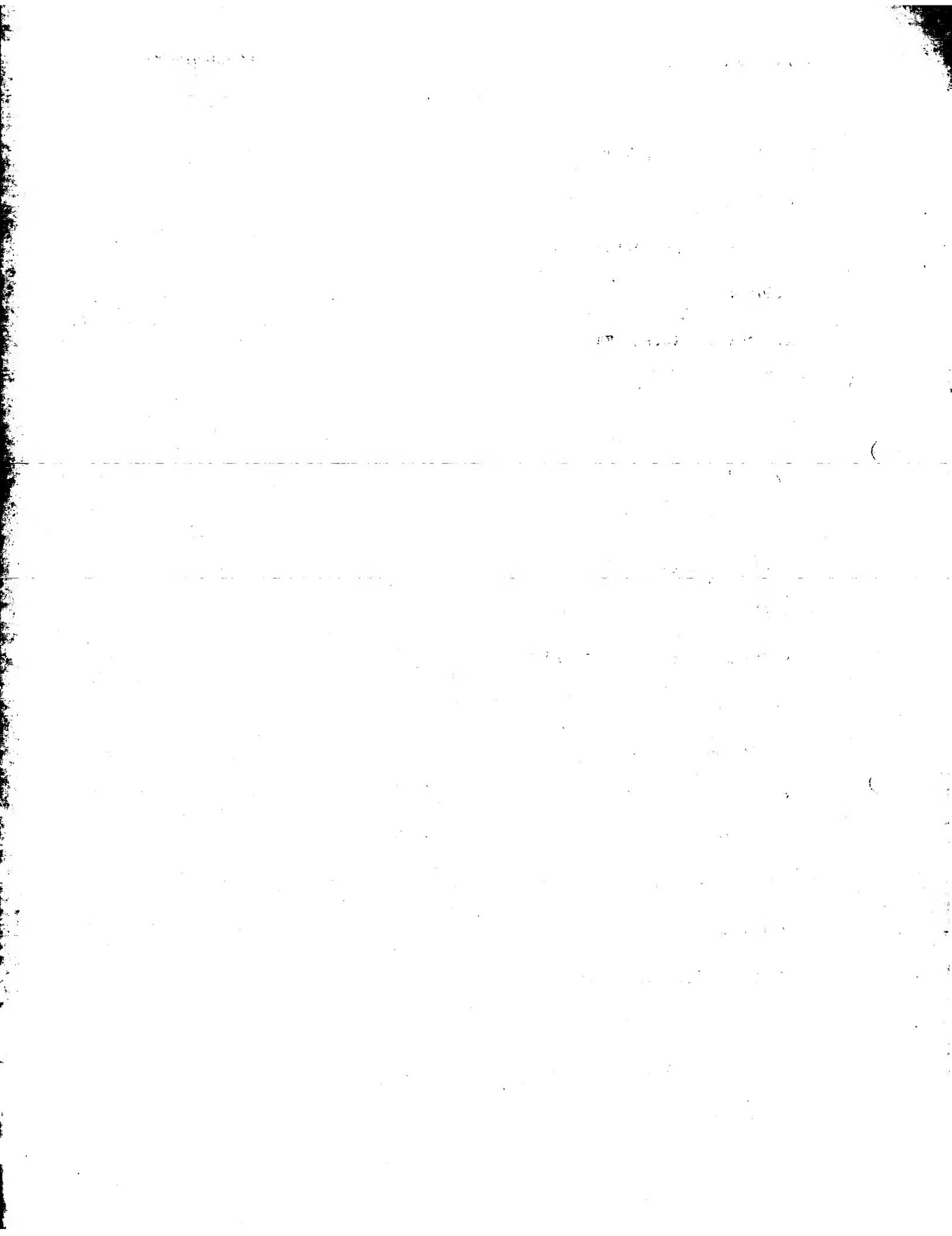
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 27

<400> 48



3 4 / 4 4

agctcgtcag cctgcggcgc c

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 28

<400> 49

tcgtcaggct gcgcccct g

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 29

<400> 50

tccacctcgg ccagcgtc a

<210> 51

<211> 23

3 5 / 4 4

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 11

<400> 51

agc tca gagc tctcgatctc agc

(

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 12

<400> 52

agagtggttg aatcgatgtg

(

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 13

{

3 6 / 4 4

<400> 53

```
gtgcgtcgctc tcagctgcaa
```

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 14

<400> 54

```
ctcgatgcta gctgcaacag
```

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 15

<400> 55

```
gatctcgctt gcaacagact
```

<210> 56

37 / 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 16

<400> 56

ctcagcgcta acagactgaa

()

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 17

()

<400> 57

tgcaacgctc tgaacagggc

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 8 / 4 4

<221> sense primer 18

<400> 58

gaacagggcg gcgcagcctg a

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 19

<400> 59

ggcgccgcag gctgacgaggc t

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 20

<400> 60

cagggcggcg caggcgtacg a

26. *Amphibolite*

27. *Amphibolite*

28. *Amphibolite*

29. *Amphibolite*

30. *Amphibolite*

31. *Amphibolite*

32. *Amphibolite*

33. *Amphibolite*

34. *Amphibolite*

35. *Amphibolite*

36. *Amphibolite*

37. *Amphibolite*

38. *Amphibolite*

39. *Amphibolite*

40. *Amphibolite*

41. *Amphibolite*

42. *Amphibolite*

43. *Amphibolite*

44. *Amphibolite*

45. *Amphibolite*

46. *Amphibolite*

47. *Amphibolite*

48. *Amphibolite*

49. *Amphibolite*

50. *Amphibolite*

3 9 / 4 4

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 21

<400> 61

(
tgacgagctg gccgaggigg a

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

(
<221> sense primer 22

<400> 62

tgcaacgatc tgaacagggc

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

(

)

4 0 / 4 4

<220>

<221> antisense primer 30

<400> 63

gttcagatcg ttcgcgttga

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 23

<400> 64

ctcgatctt gtttcaacag

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

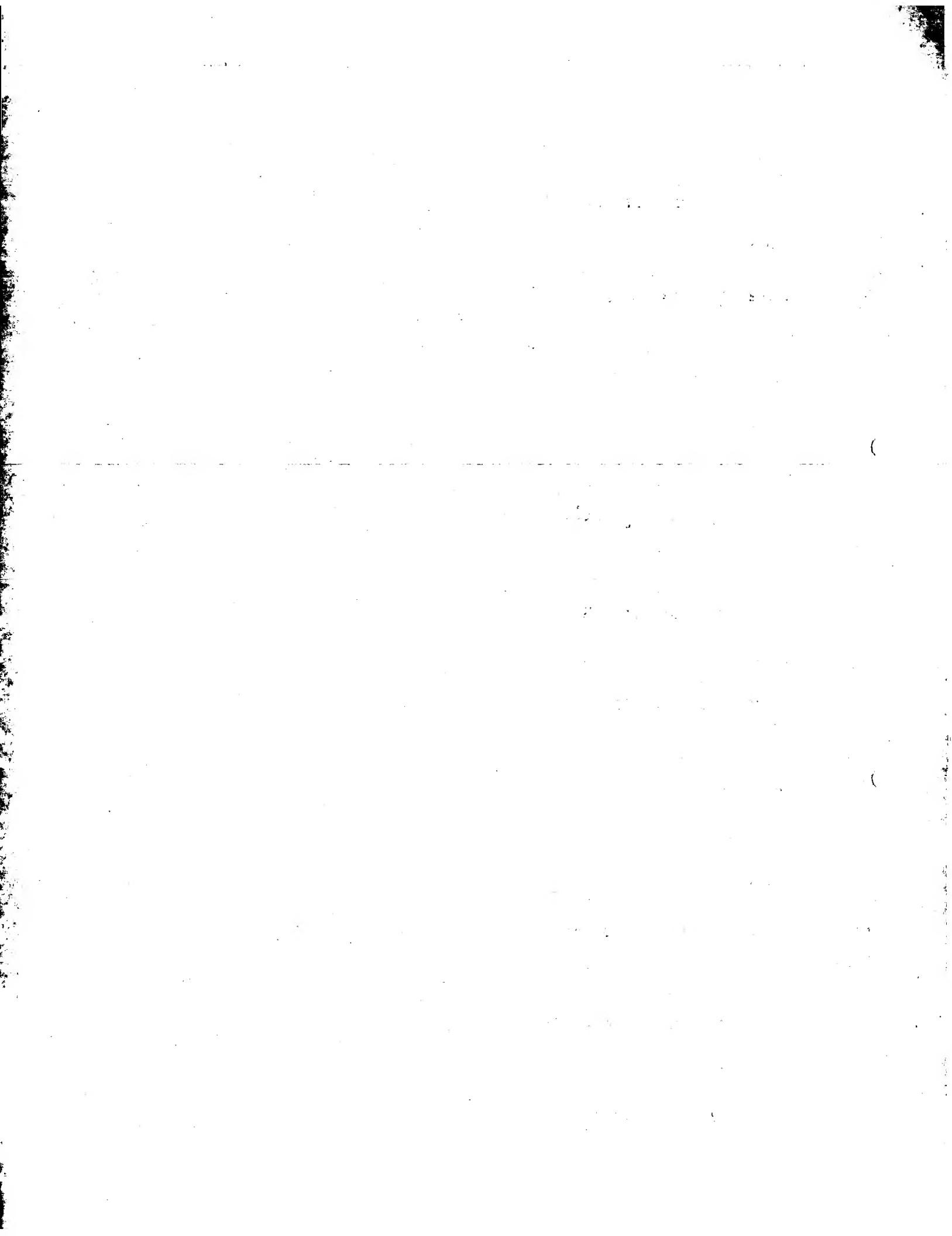
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 31

<400> 65

tctgttgcaa cagagatcg



4 1 / 4 4

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 24

(

<400> 66

ctcgatctcg gttgcaacag

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

(

<220>

<221> antisense primer 32

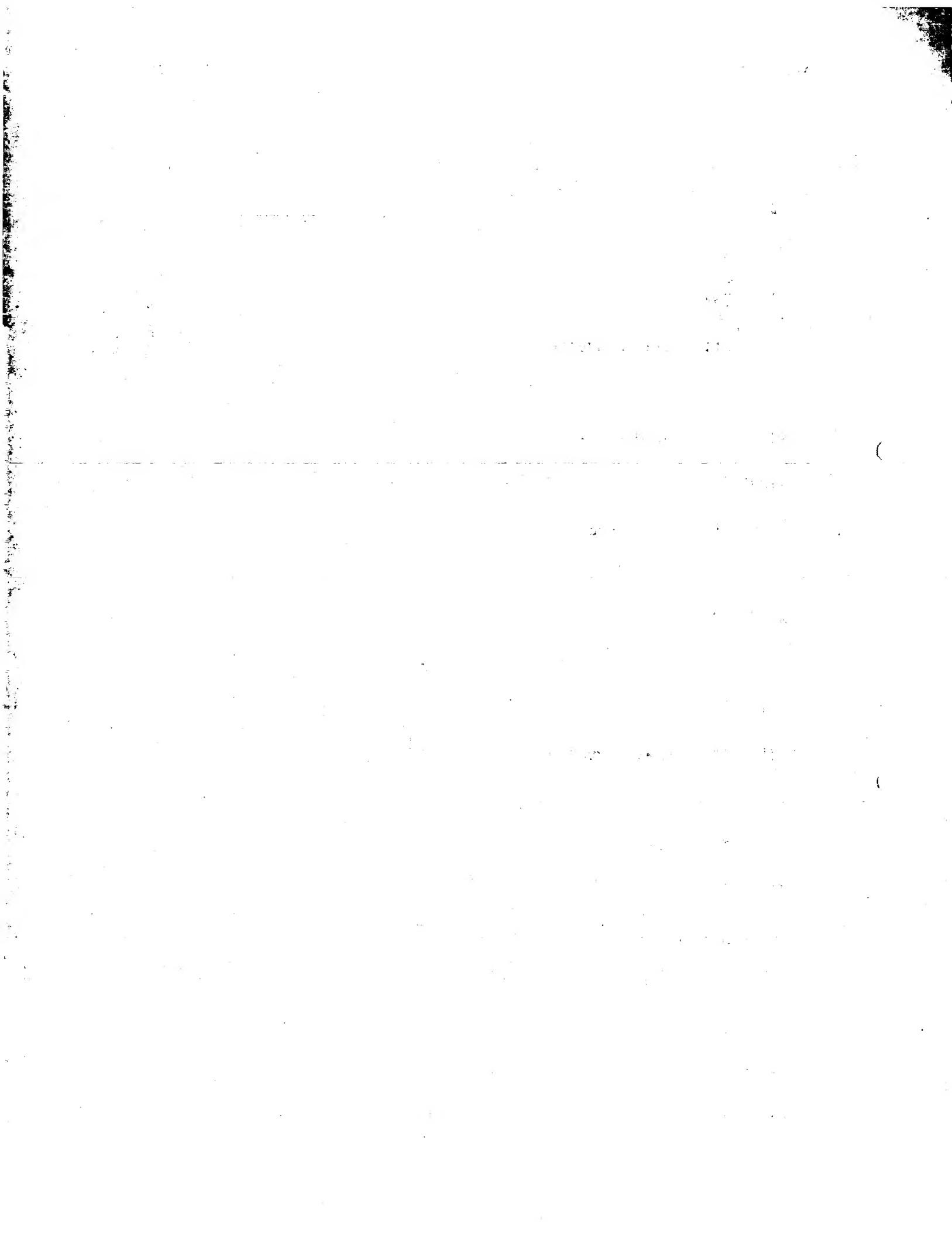
<400> 67

tctgttgcaa ccgagatcga

<210> 68

<211> 20

<212> DNA



4 2 / 4 4

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 25

<400> 68

ctcgatctca ct tgcaacag

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 33

<400> 69

tctgttgcaa gt gaga t c g a

<210> 70

<211> 20

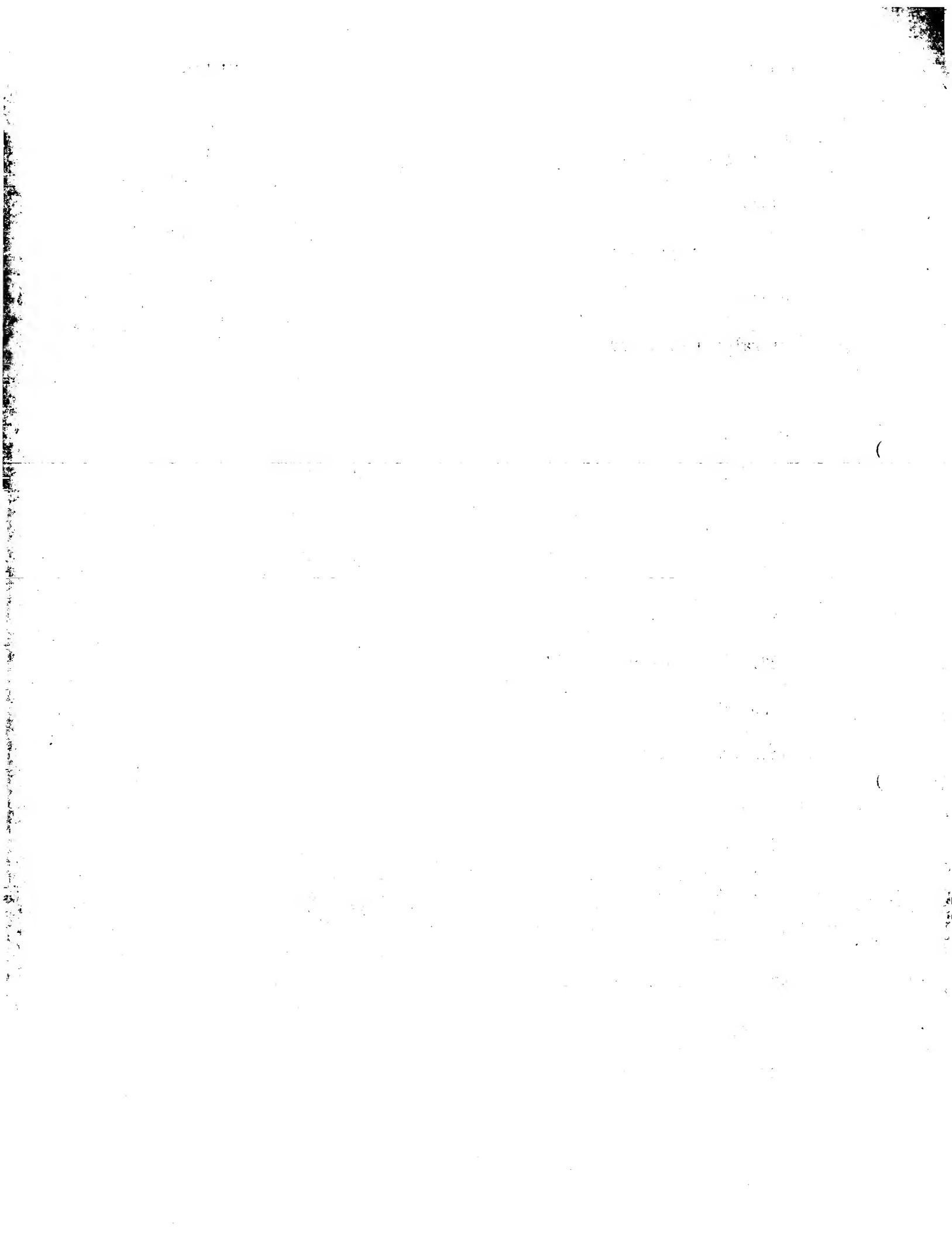
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sense primer 26

<400> 70



4 3 / 4 4

ctcgatctcc tttgcaacag

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer 34

<400> 71

tctgttgcaa aggagatcga

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

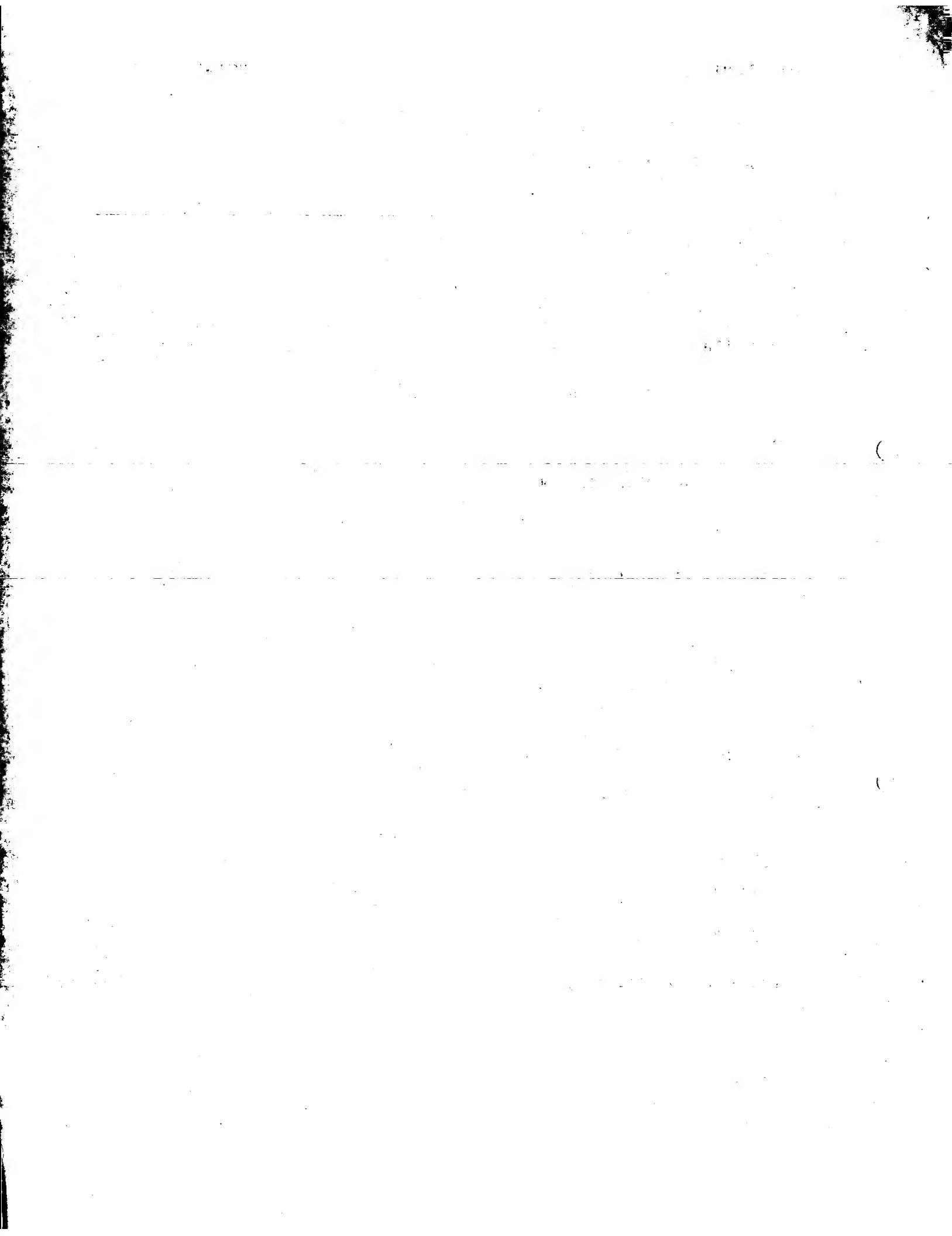
<221> sense primer 27

<400> 72

accacgccag aaccttgta g

<210> 73

<211> 22



4 4 / 4 4

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> antisense primer35

<400> 73

ctgaaaaatct tctctcatcc gc

()

{

(

)

1/22

図1

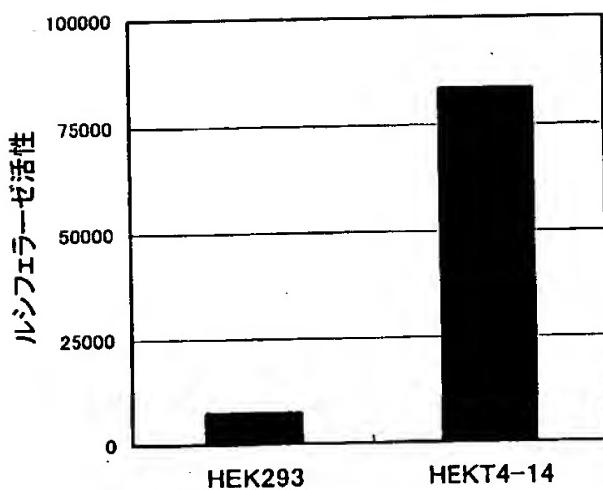
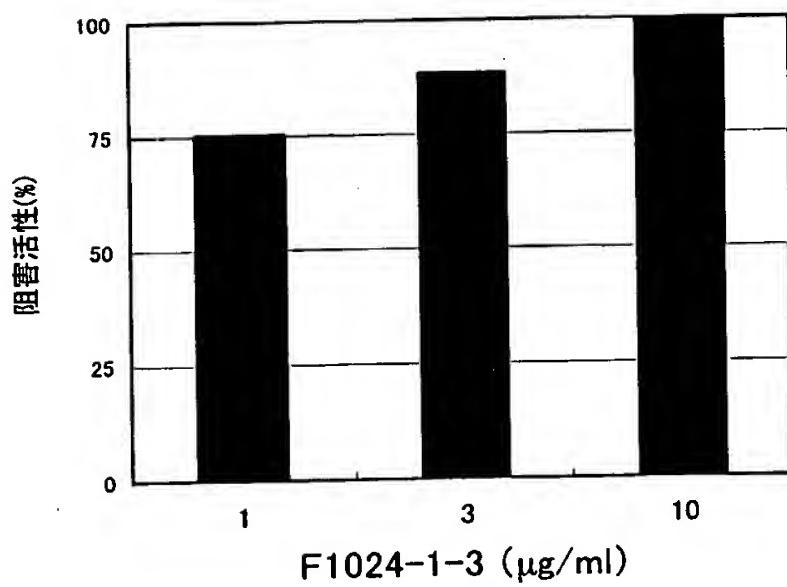


図2



(

(

2/22

図3

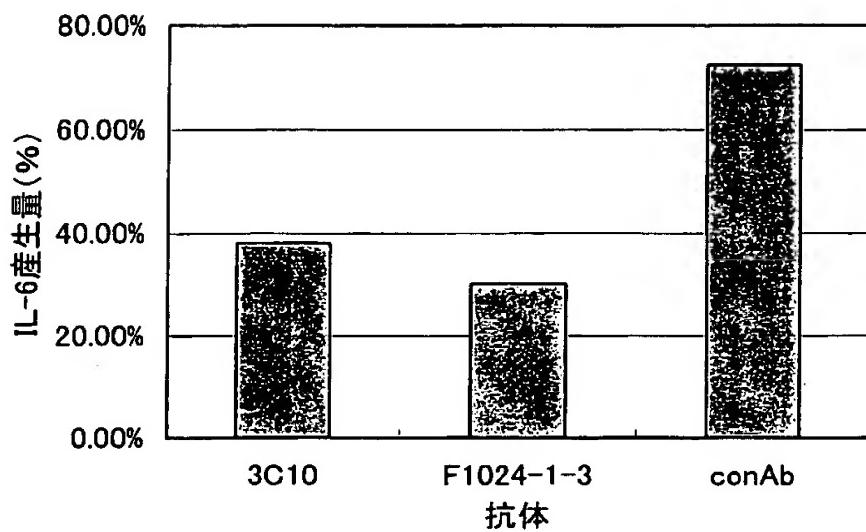
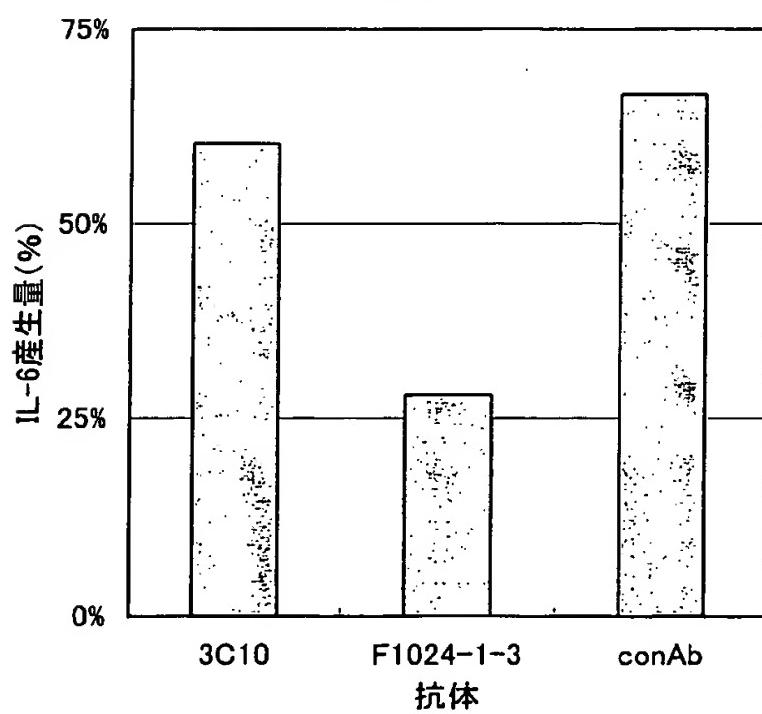
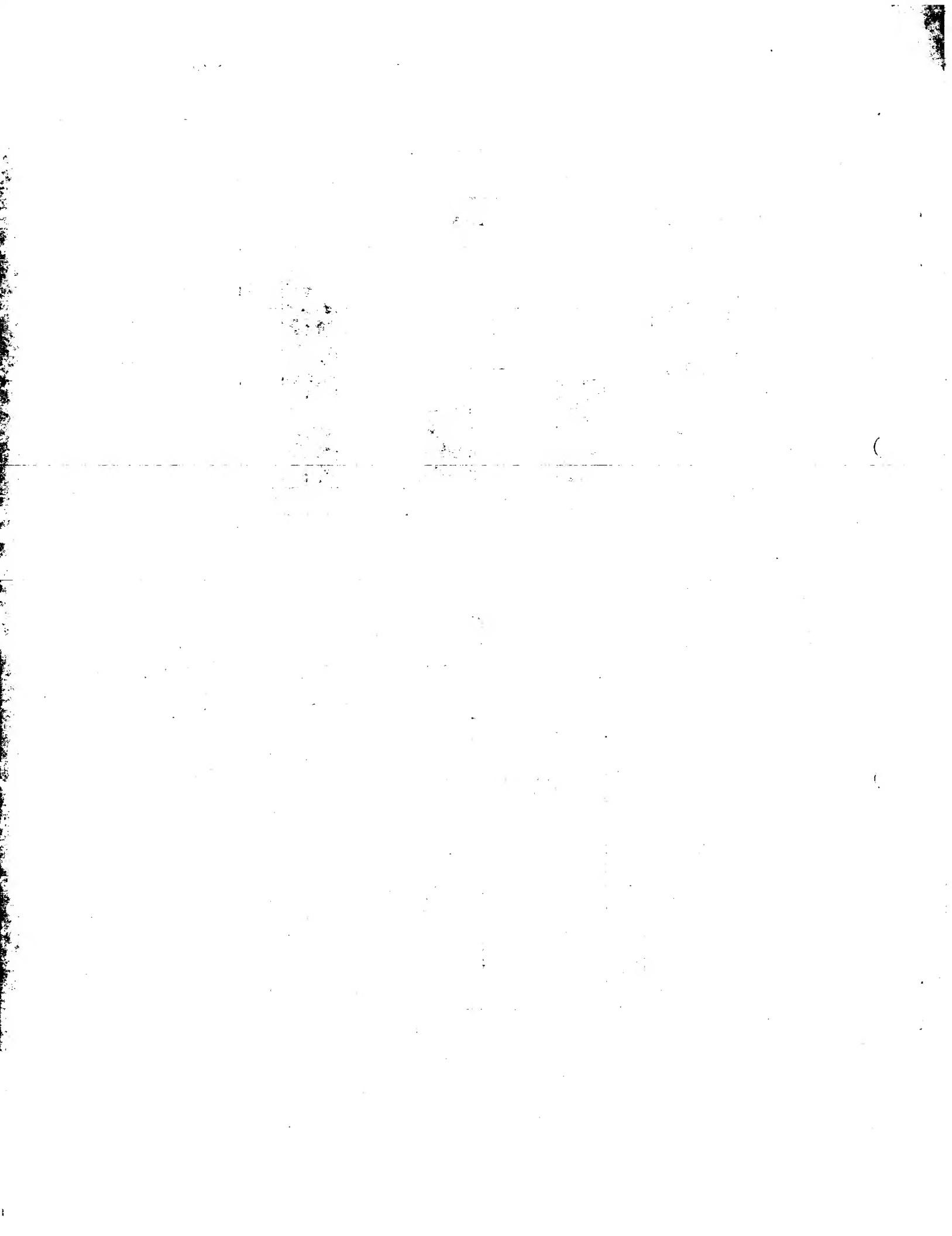
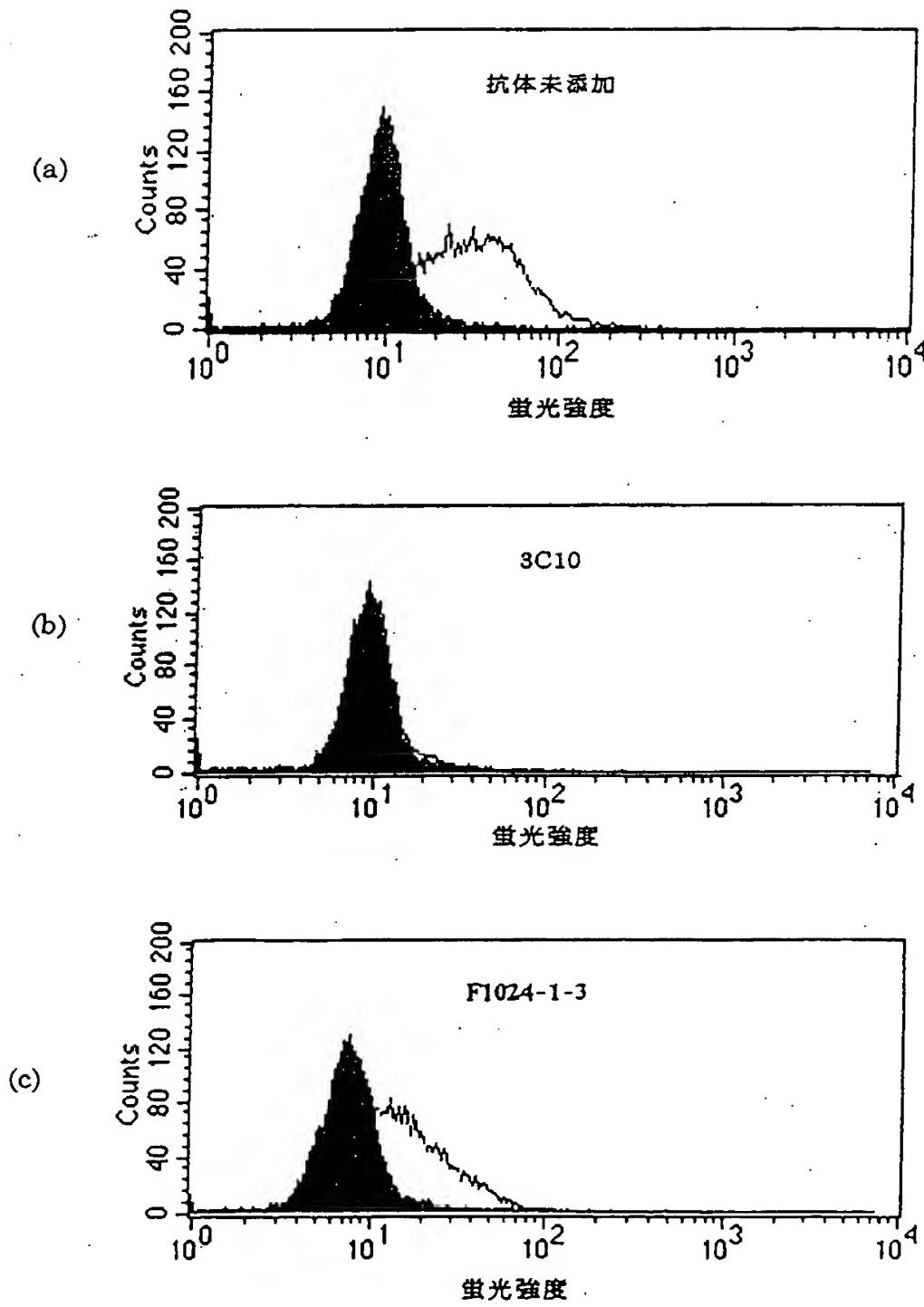


図4





3/22
※ 5



(

(

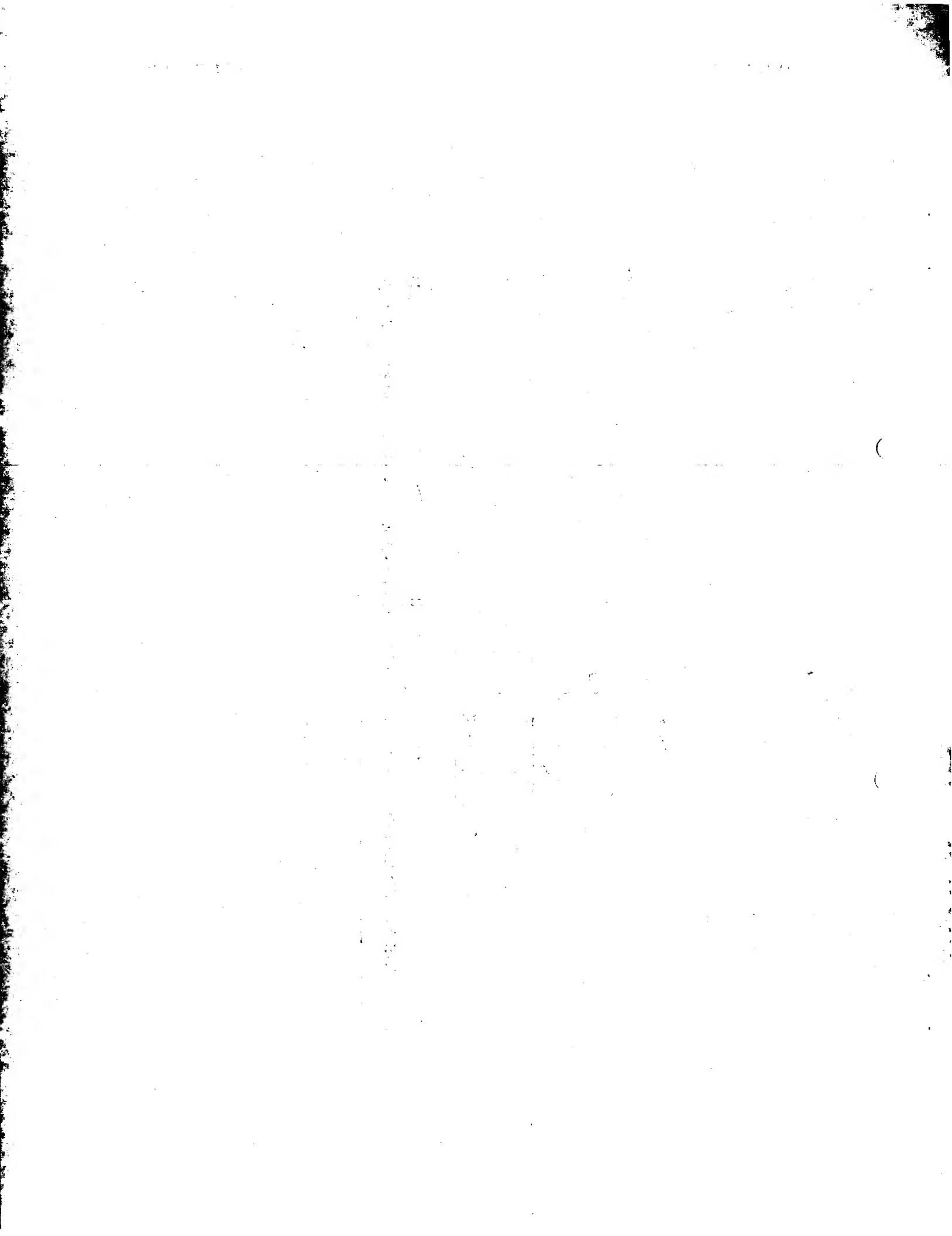
4/22

6

ペプチド	阻止活性
A	+
B	+
C	-
D	-
E (コントロール)	-

LDLSCNRLNRAPQPDELPEVDNLTLGNPFLVPGTALPHEGSMNSGVVACARSTI SVGVSGTI
283 301 307 315 318 329 331 343

A B C D



5/22

図7

sCD14欠失改变体			結合活性		
タイプ	欠失位置	特徴	F 1024-1-3	3C10	MEM-18
1-356	-	-	+	+	+
1-328	C末	-	+	+	+
1-315	C末	-	+	+	+
1-307	C末	-	(+)	+	+
1-285	C末	-	-	+	+
1-246	C末	-	-	+	+
1-183	C末	-	-	+	+
1-152	C末	-	-	+	+
1-307	△7-11	3C10 結合領域	+	-	+
1-307	△57-64	MEM-18 結合領域	+	+	-
1-307	△180-234	-	+	+	+
1-307	△235-282	-	+	+	+
1-307	△180-282	-	+	+	+

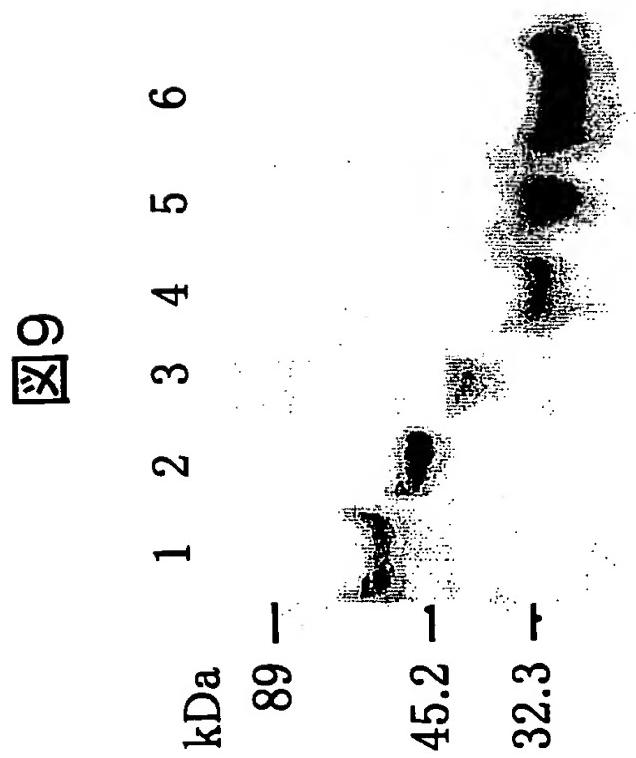
図8

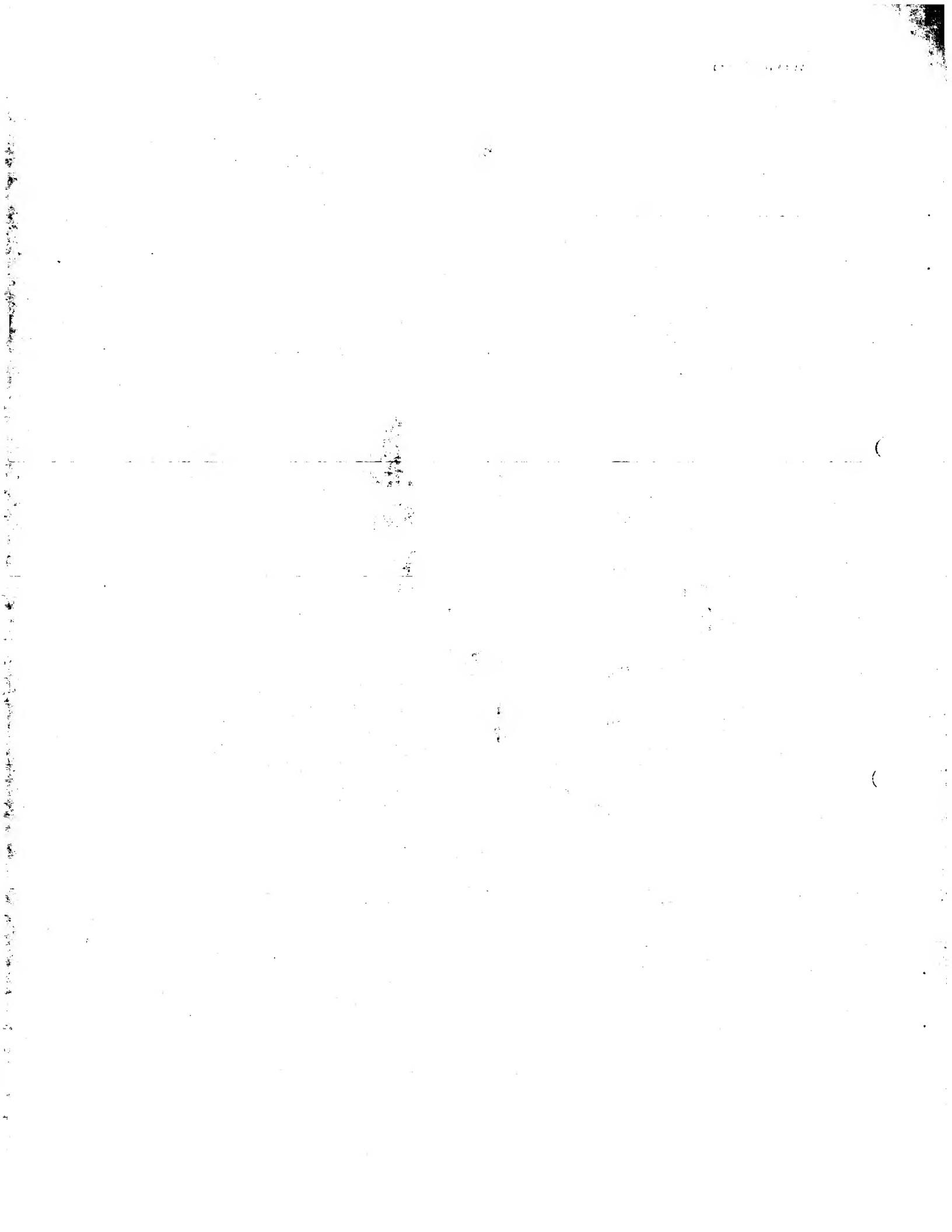
sCD14アミノ酸置換改变体		結合活性		
タイプ	置換位置	F 1024-1-3	3C10	MEM-18
1-307	-	+	+	+
1-307	D 284 A	+	+	+
1-307	S 286 A	+	+	+
1-307	S 286 K	+	+	+
1-307	C 287 A	+	+	+
1-307	R 289 A	+	+	+
1-307	P 294 A	-	+	+

(

(

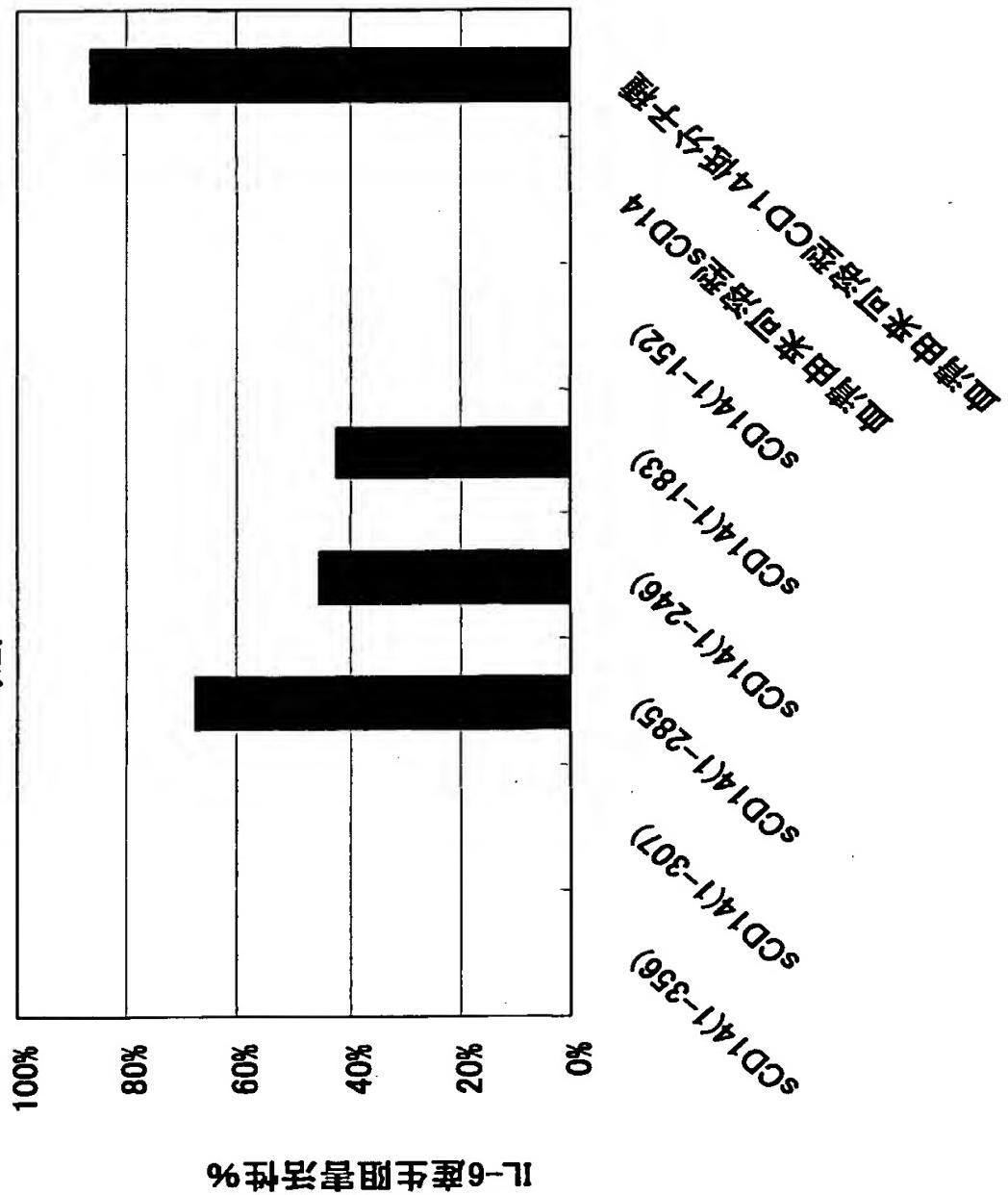
6/22





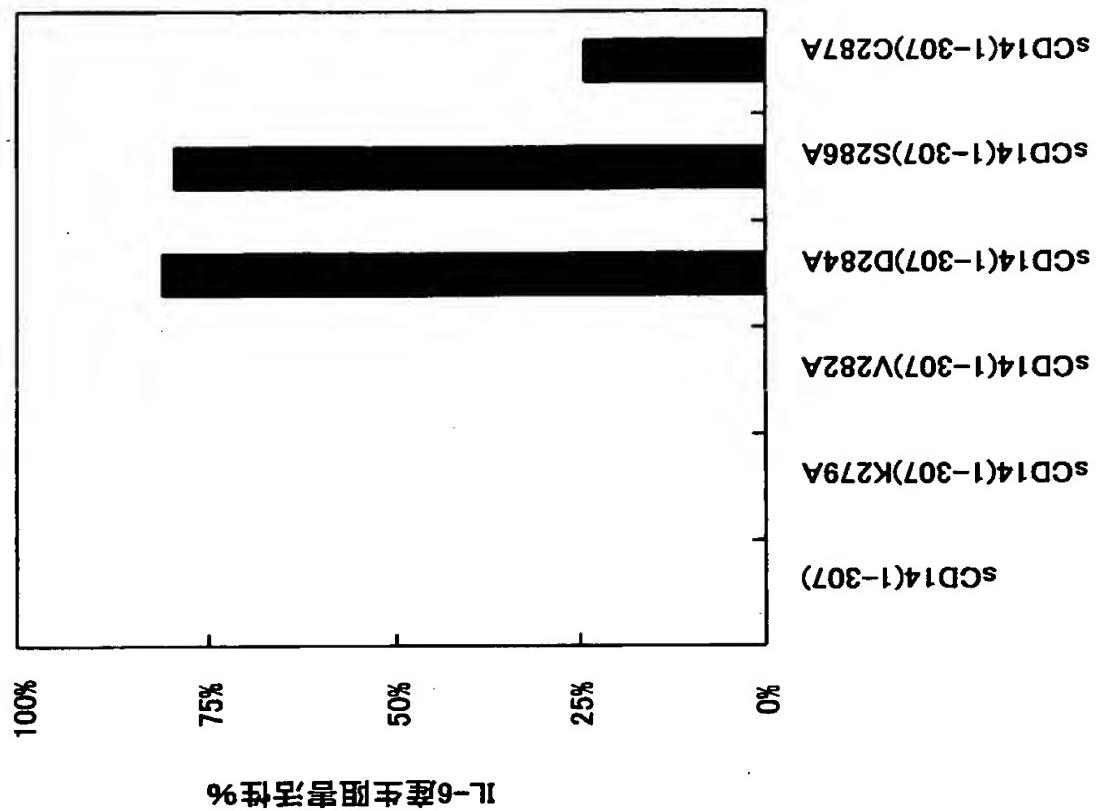
7/22

図10



8/22

図11

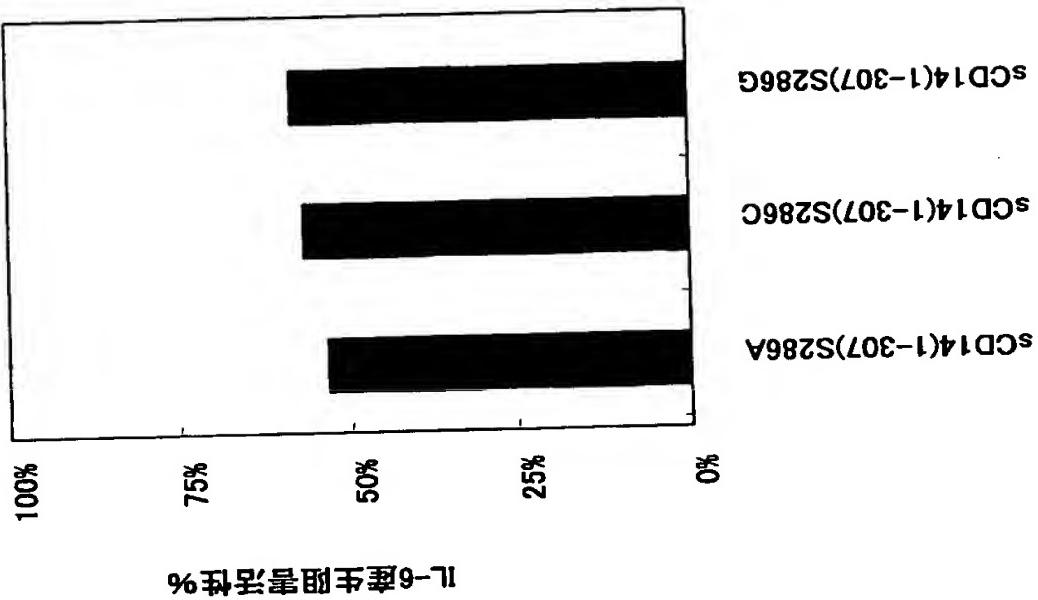


(

(

9/22

図12

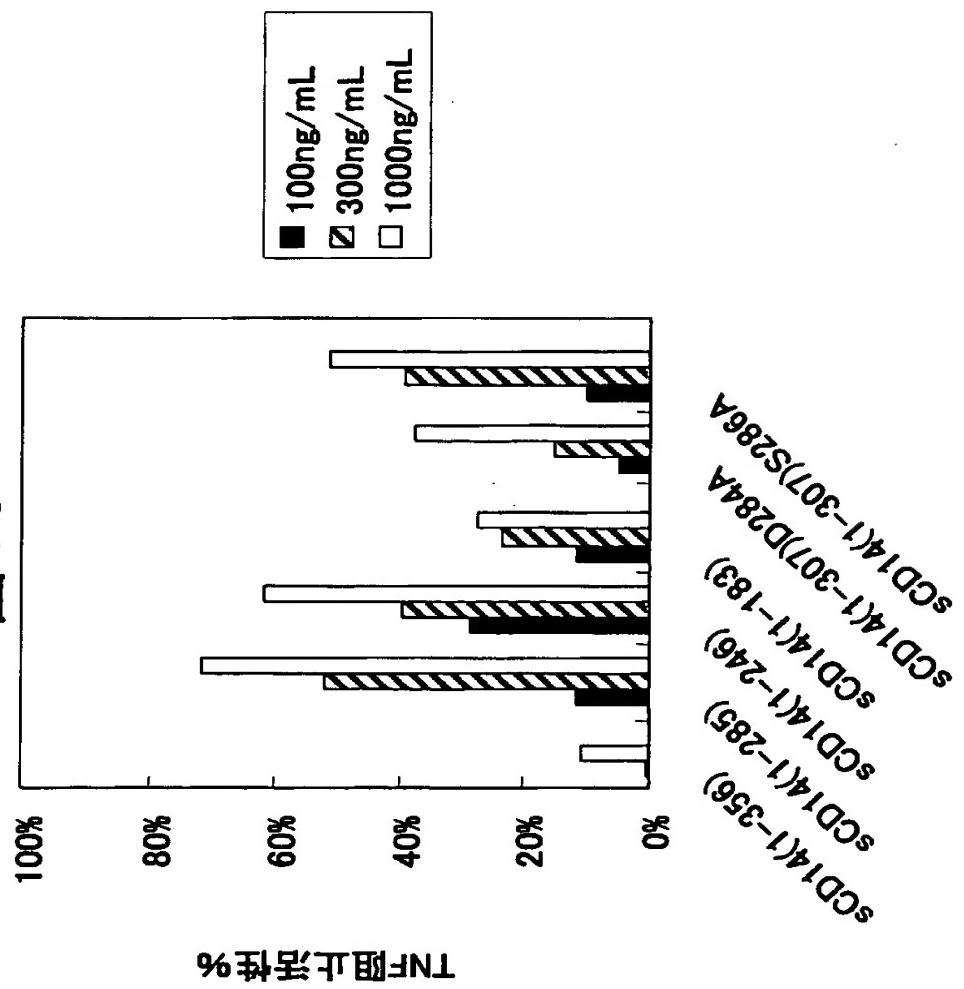


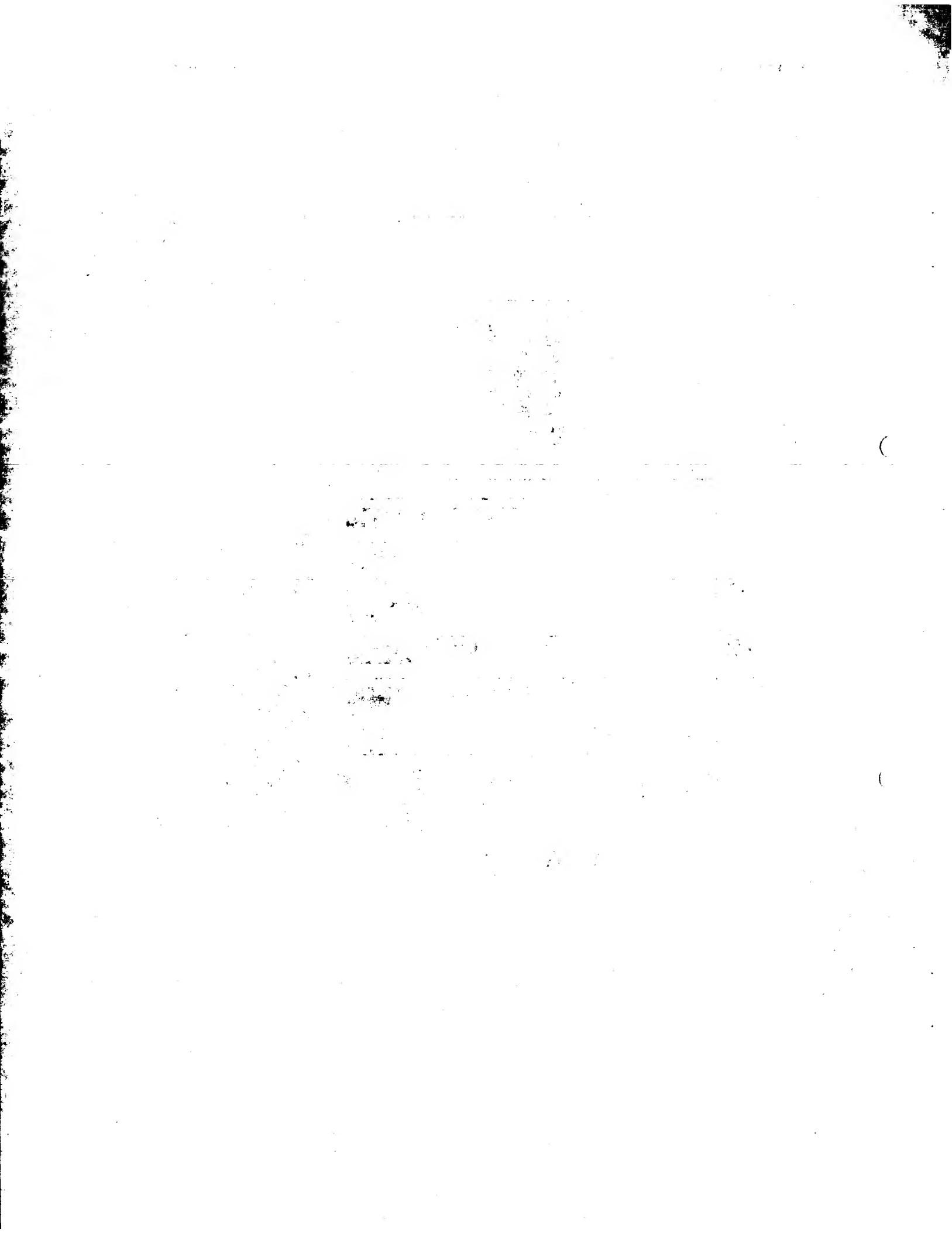
(

(

10/22

図13





11/22

図 14

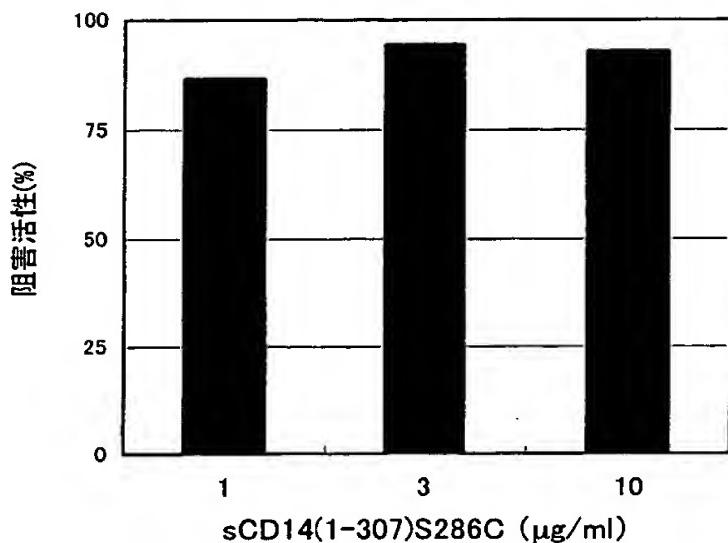
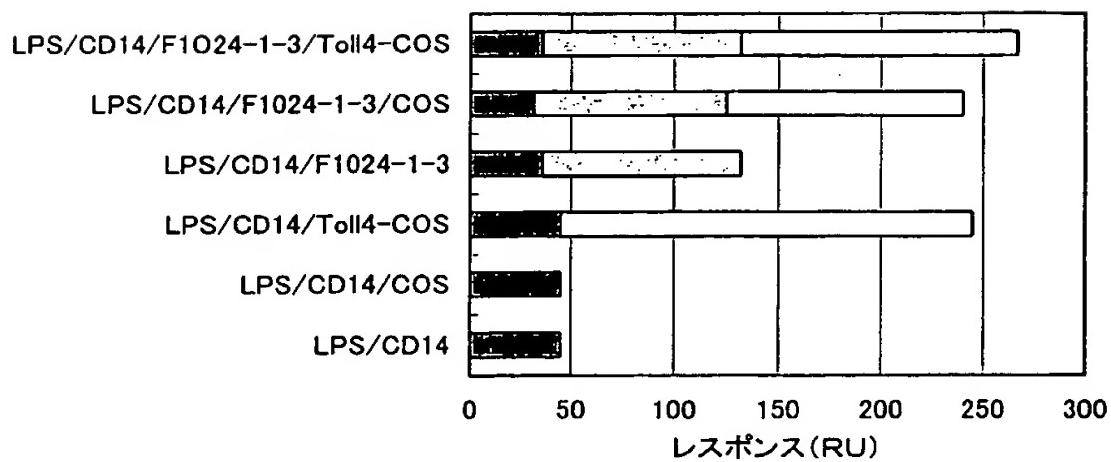
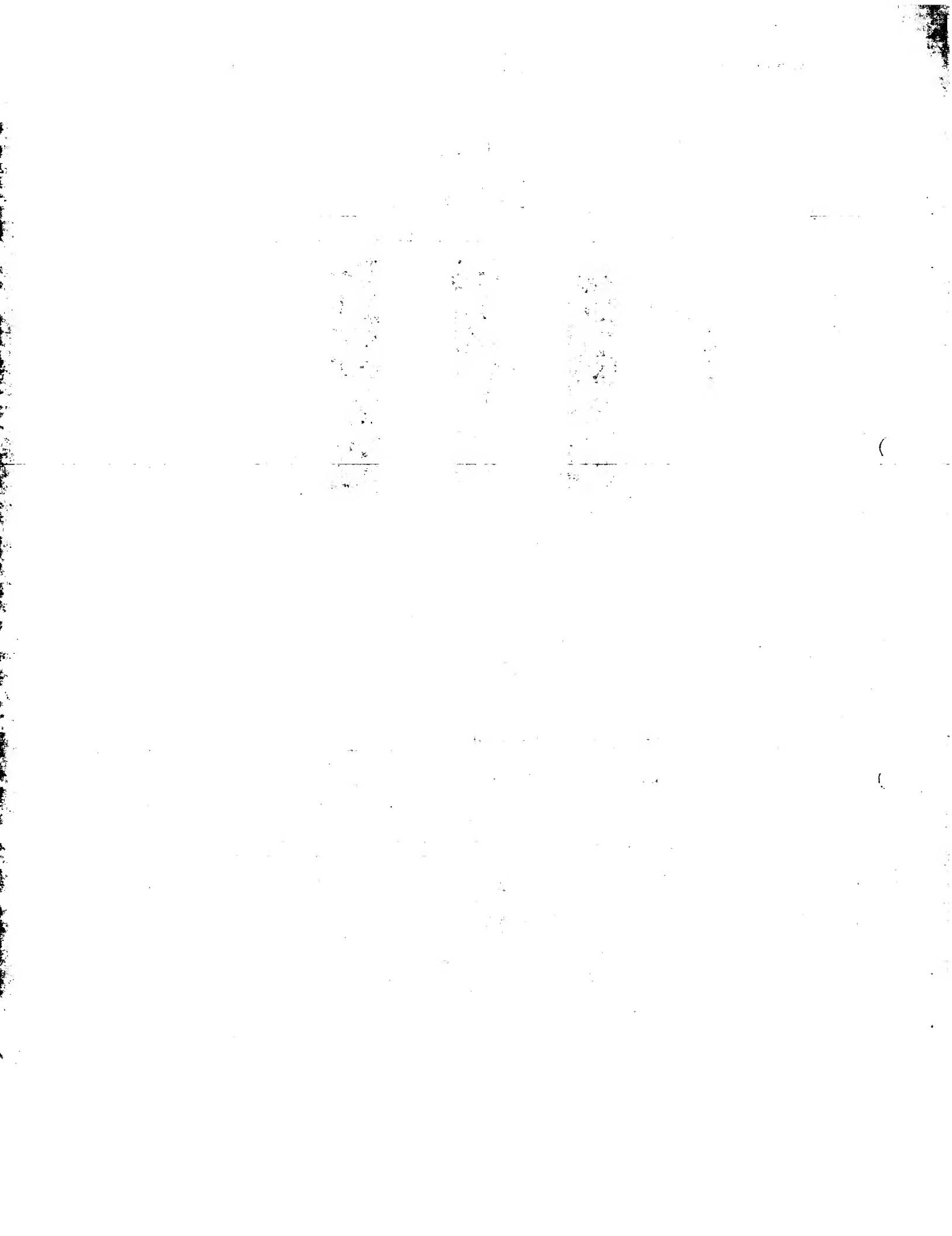


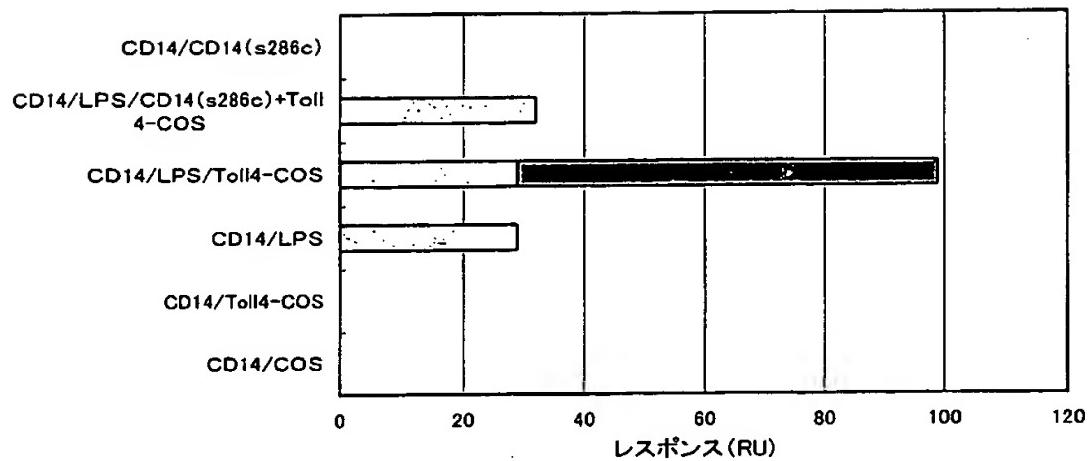
図 15





12/22

図 16



* CD14(S286C)はCD14(1-307)(S286C)である。

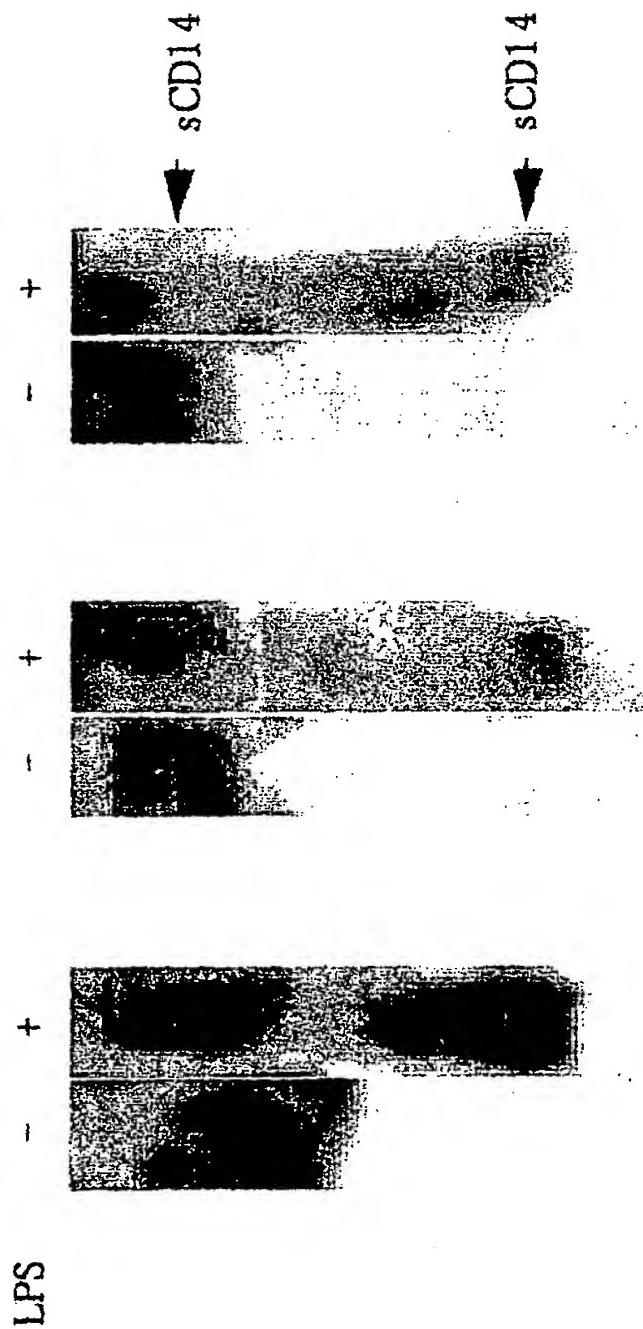
(

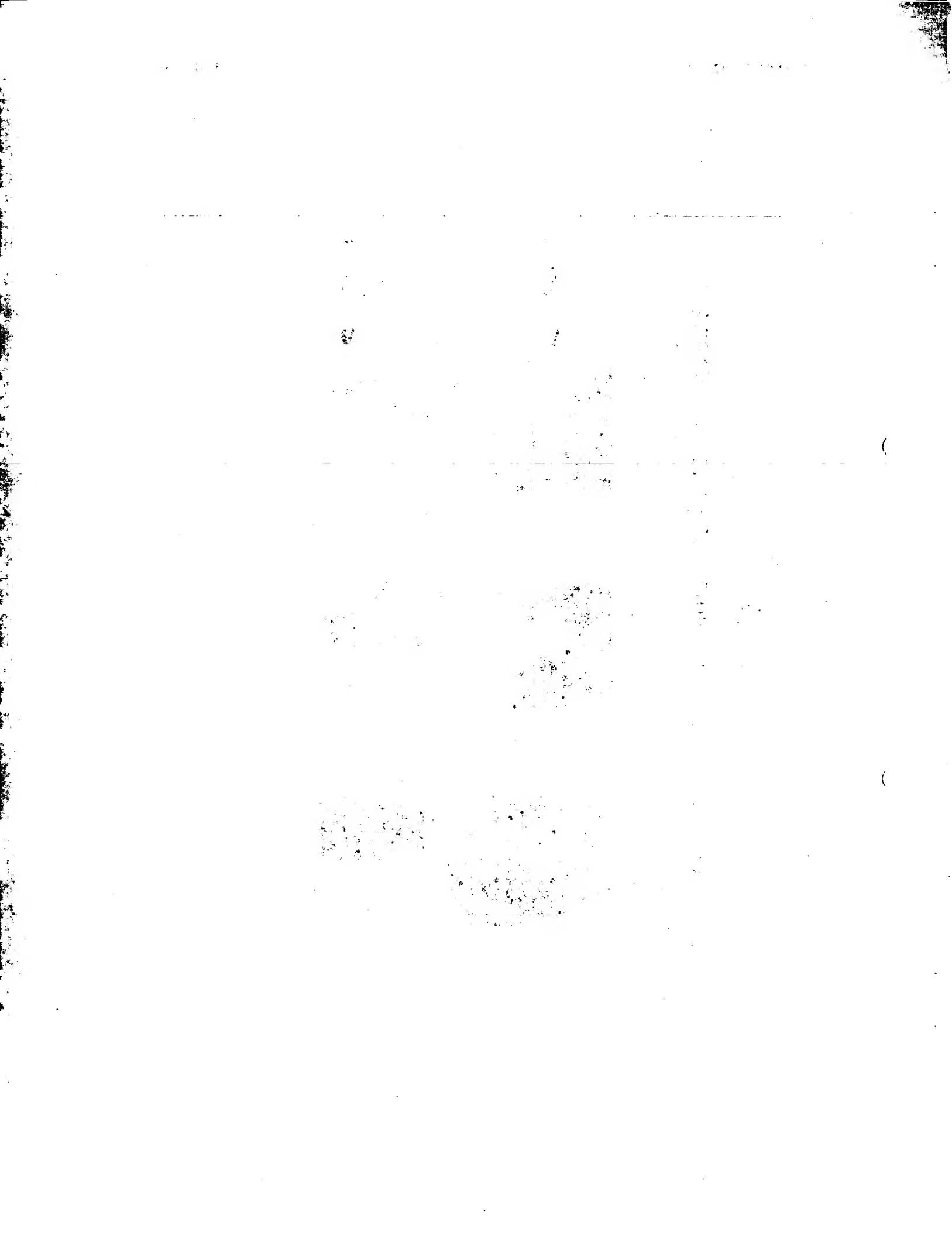
(

13/22

☒ 17

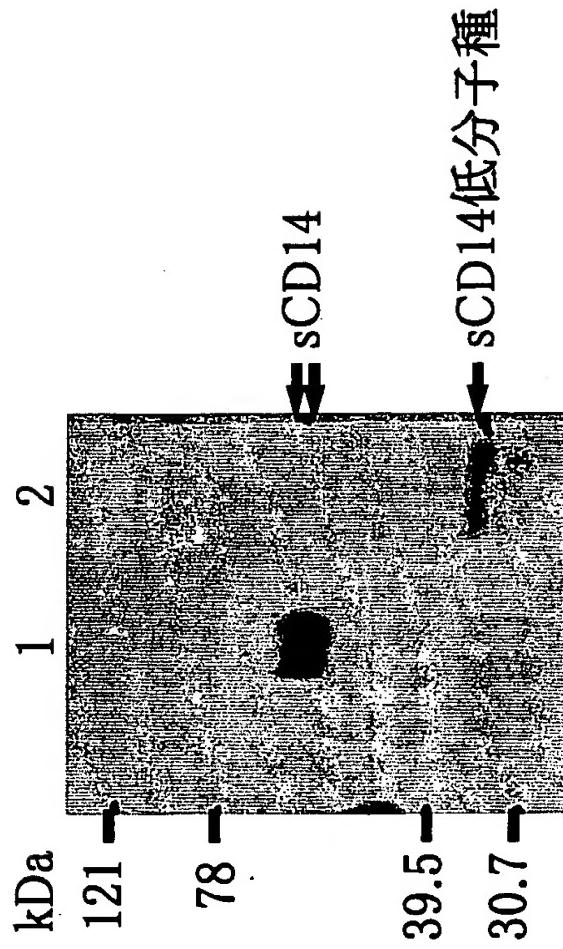
sCD14(1-356) sCD14(1-307) sCD14(1-307)s286A

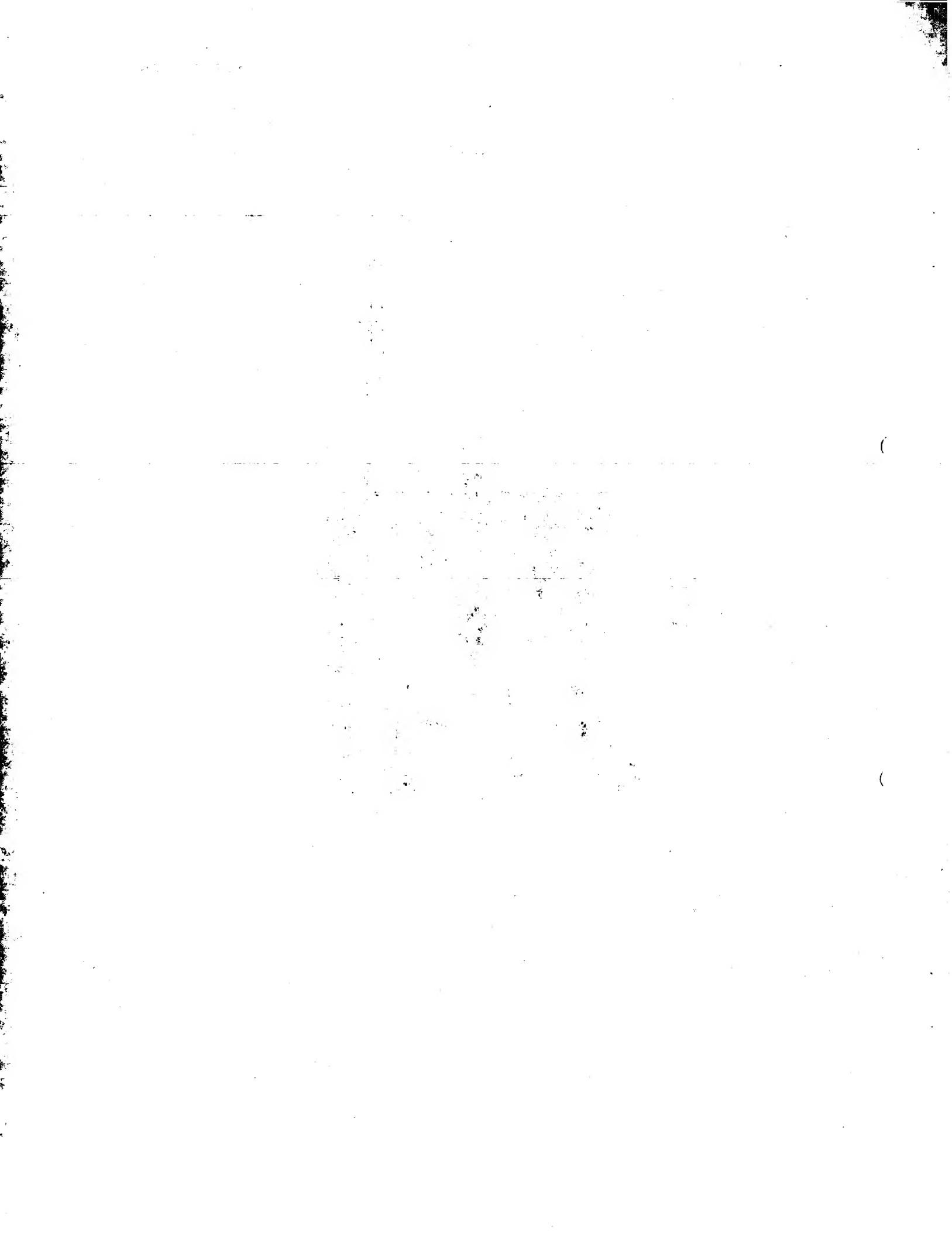




14/22

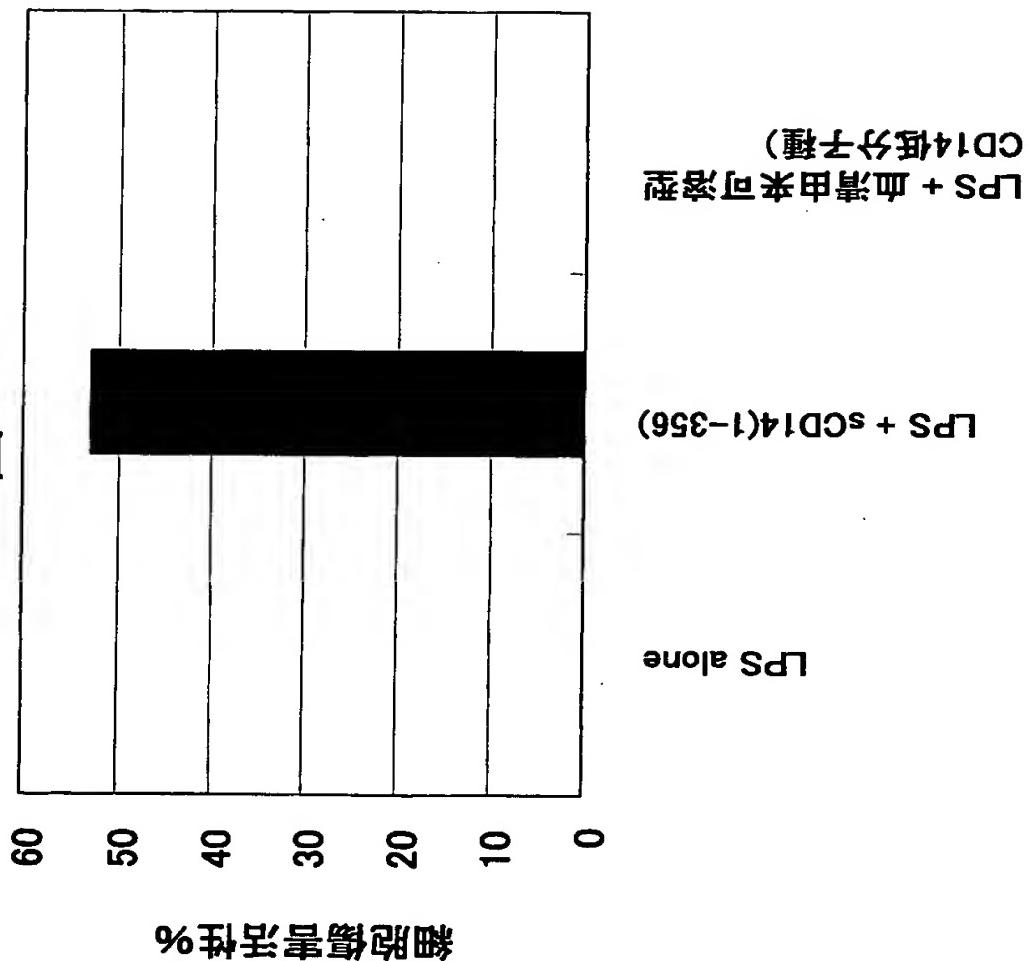
図18





15/22

图 19

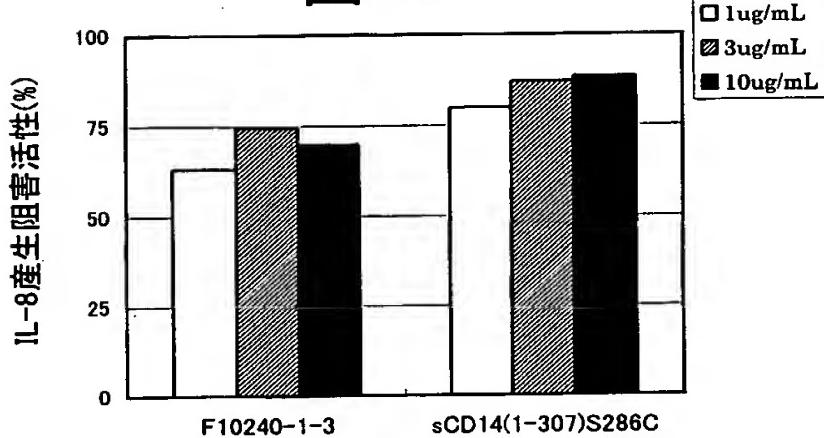


(

{

16/22

図20

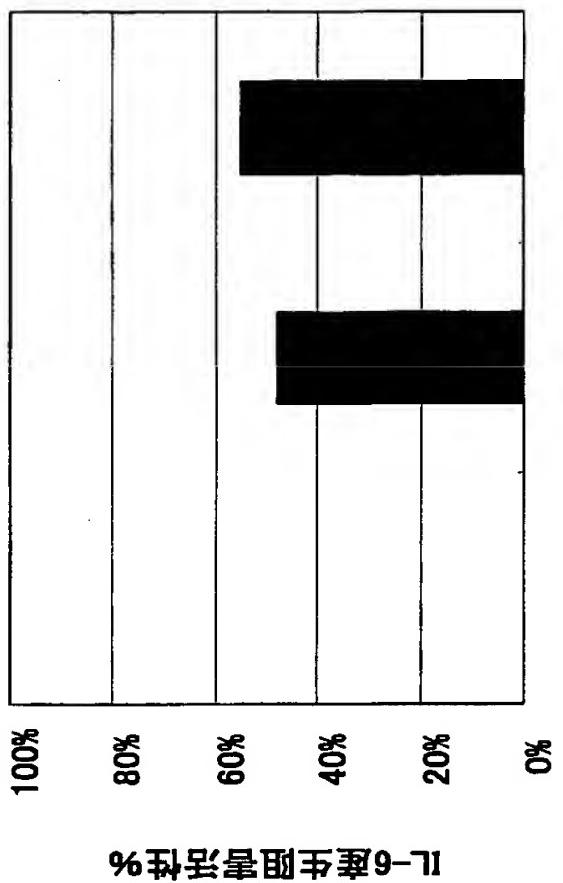


(

(

17/22

図21

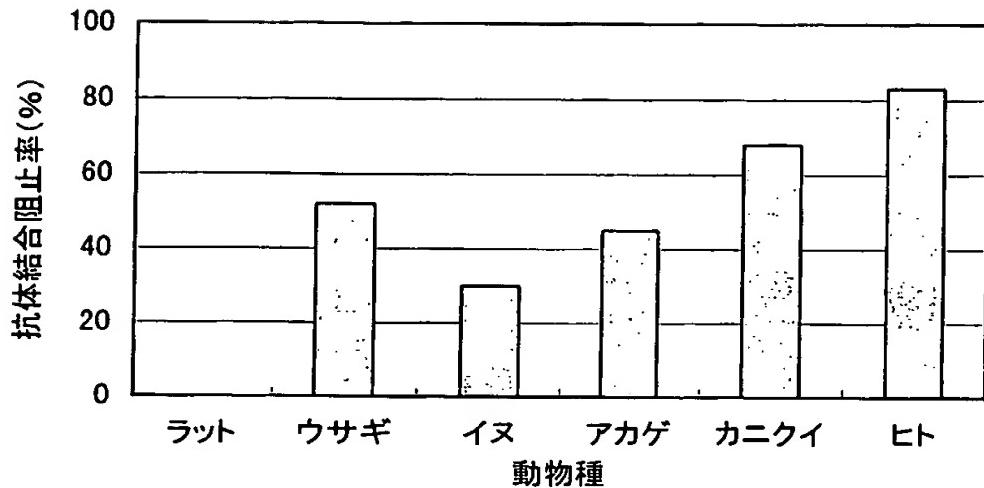


(

{

18/22

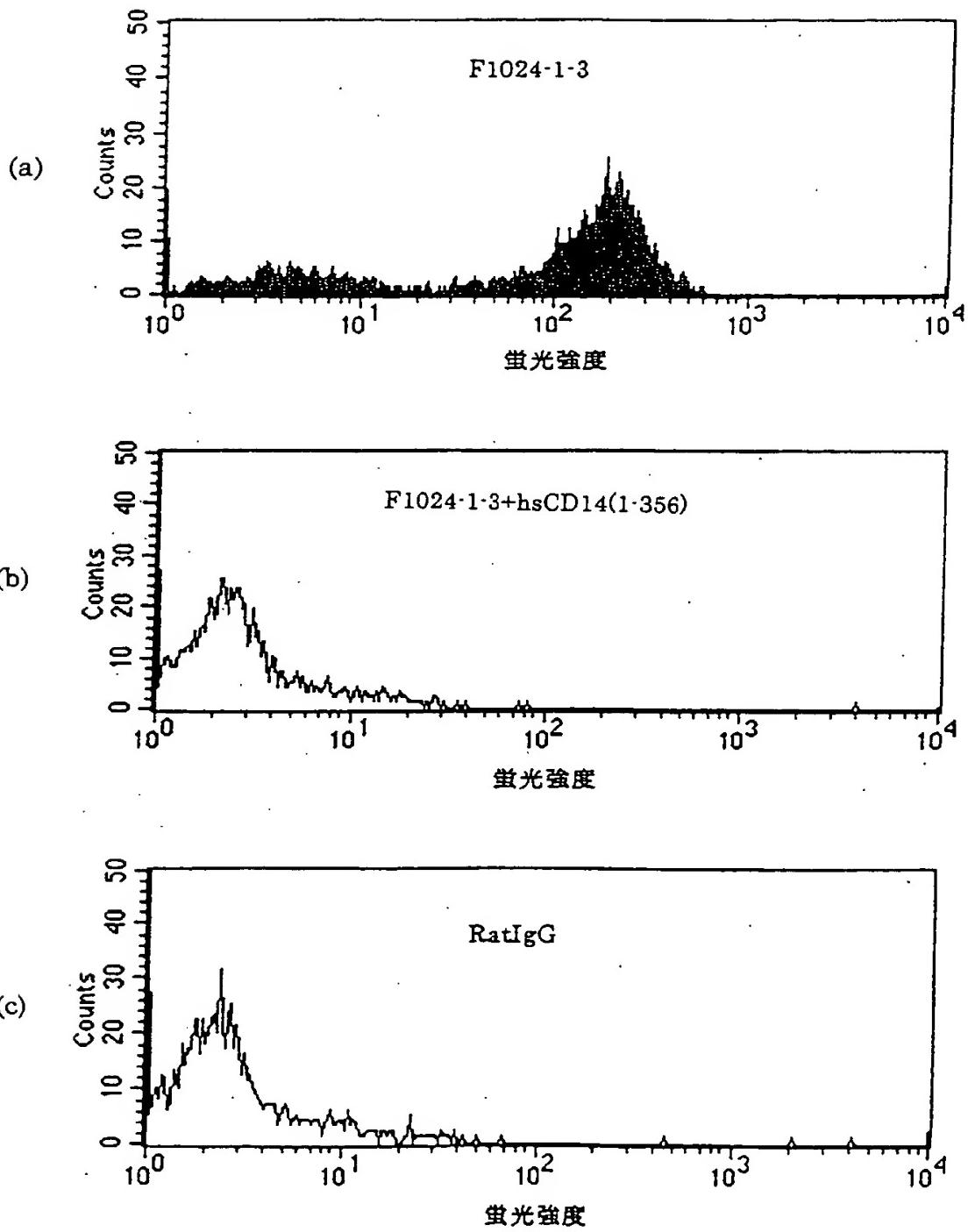
図22



(

(

19/22
図23



(

)

20/22

図24

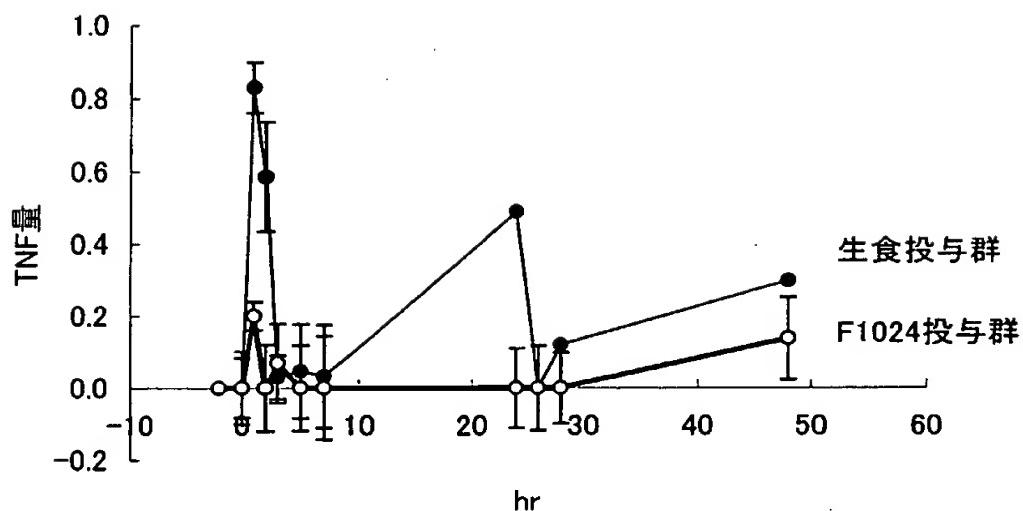
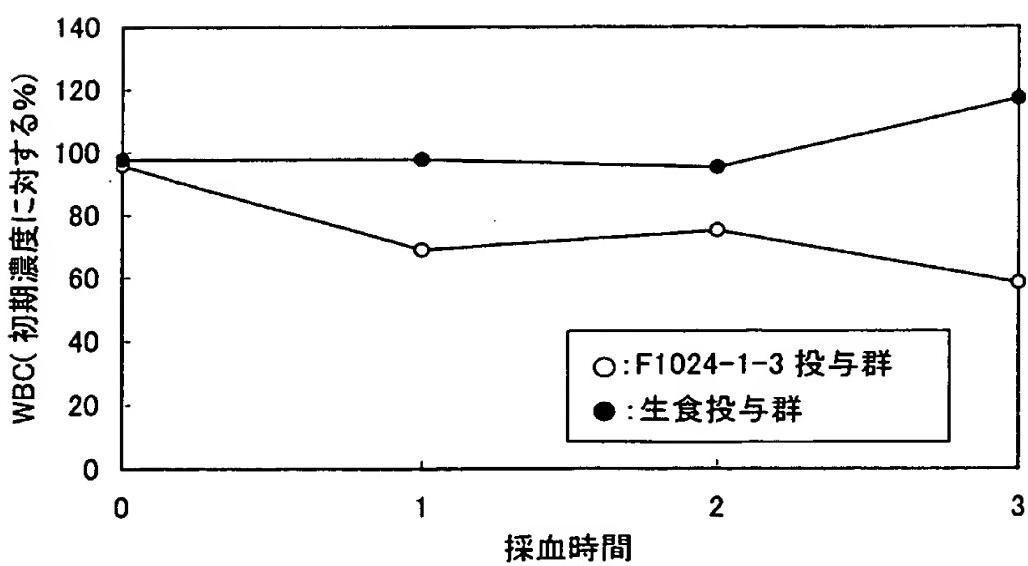


図25

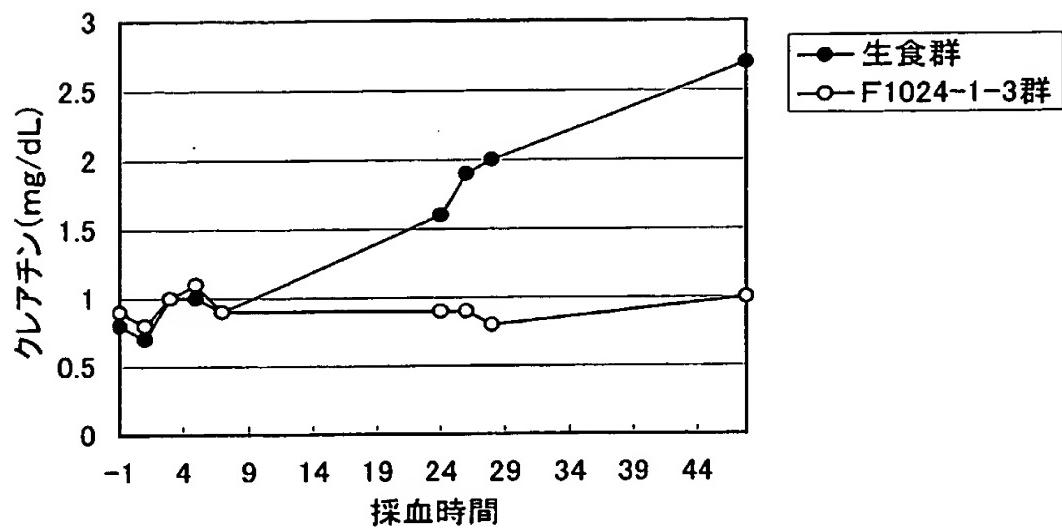


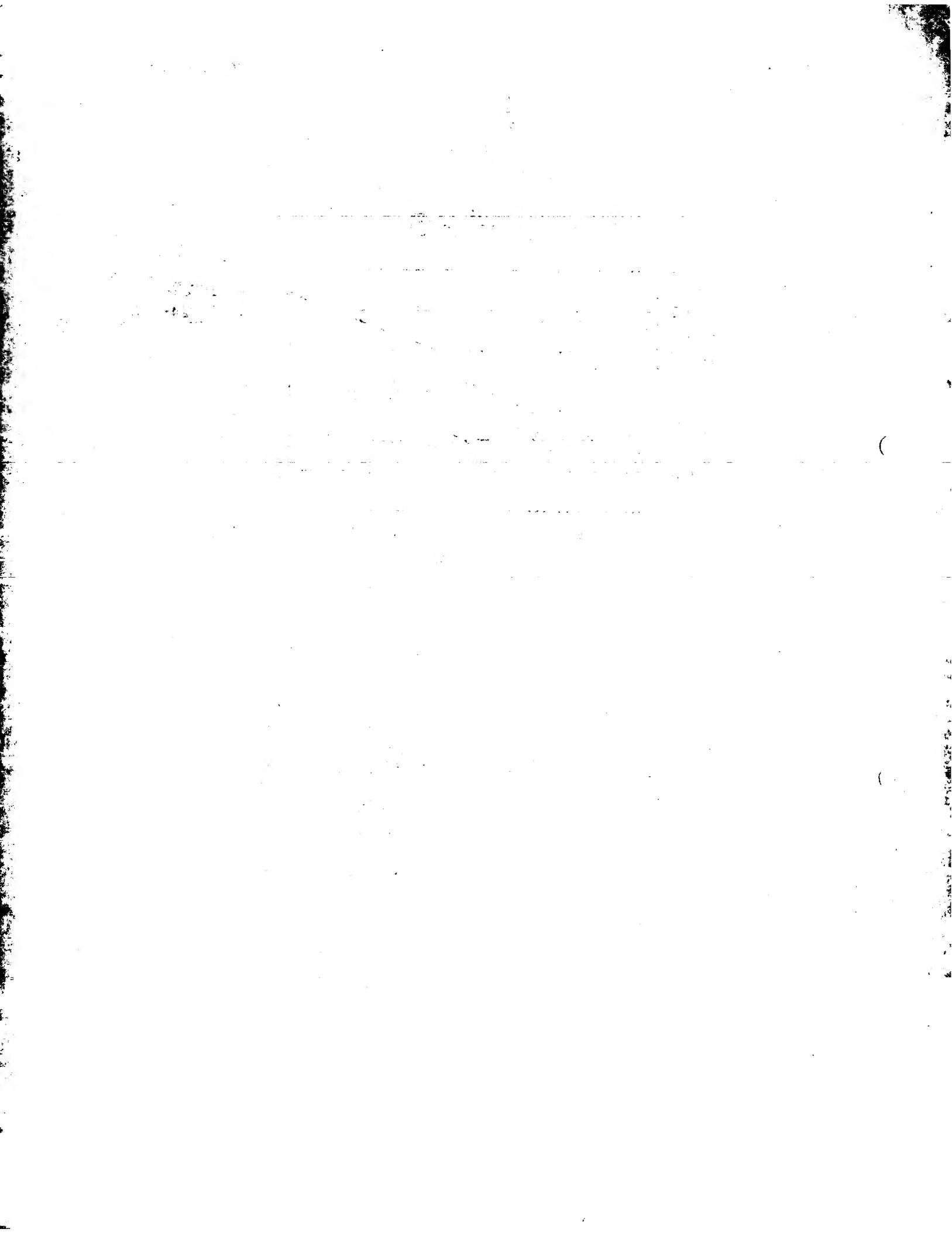
(

(

21/22

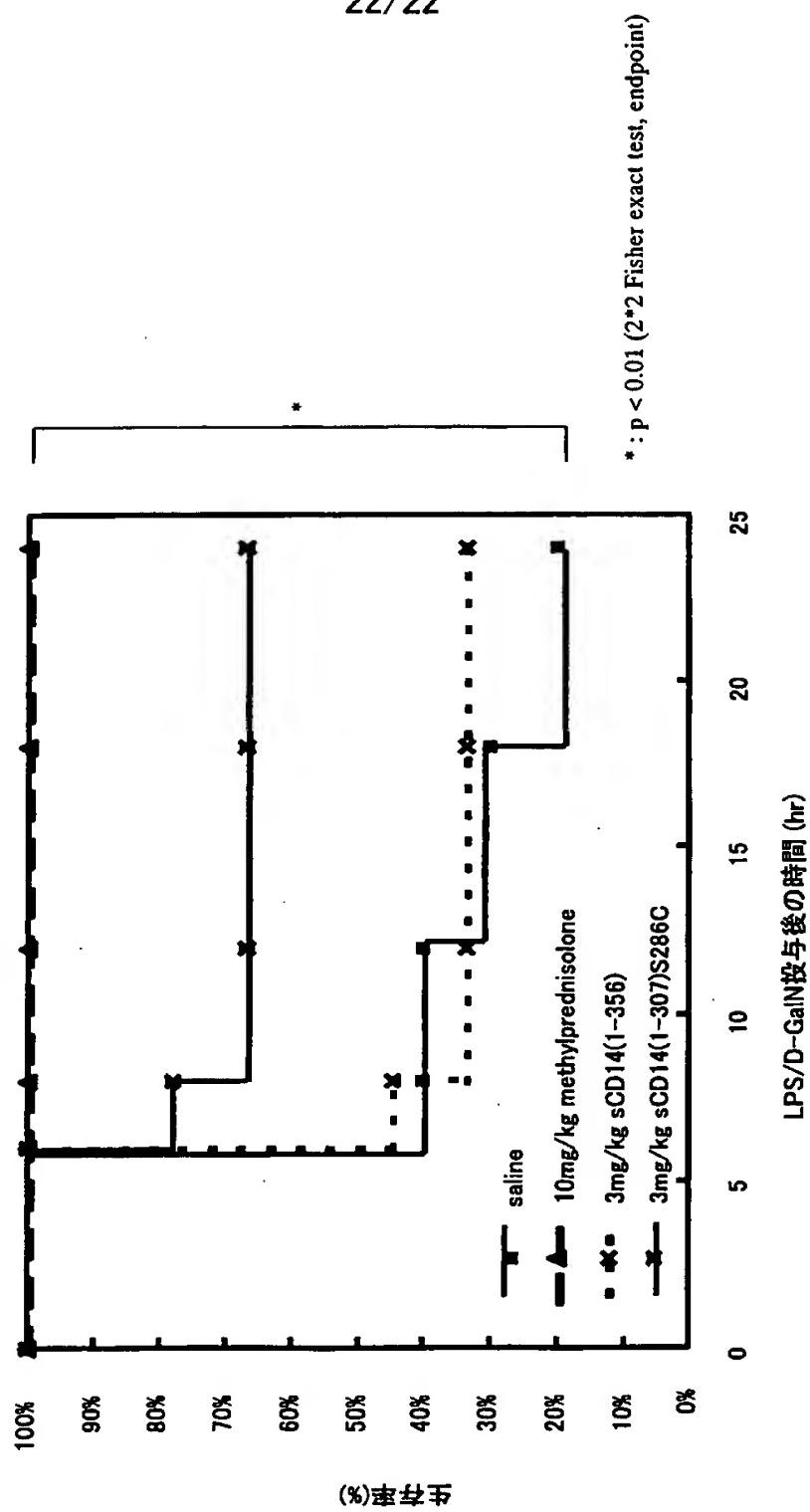
図26

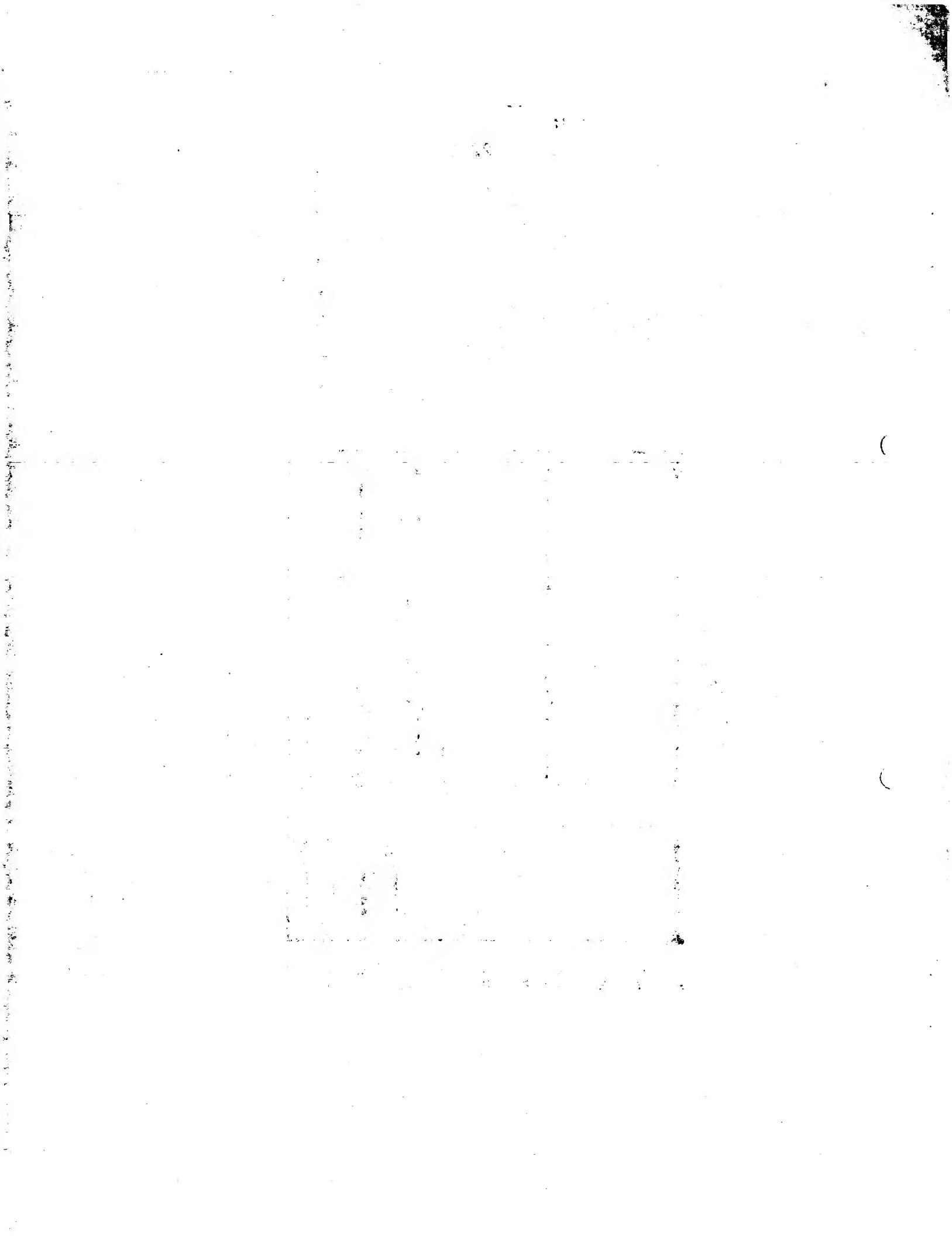




22/22

図27





A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/00, C07K7/08, 14/705, 16/28, A61K45/00, A61P31/04,
G01N33/15, 33/50, 33/53, 33/577 43/00, A61K 38/02, 39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/00, C07K7/08, 14/705, 16/28, A61K45/00, A61P31/04,
G01N33/15, 33/50, 33/53, 33/577 43/00, A61K 38/02, 39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), REGISTRY(STN), MEDLINE(STN), Genbank/EMBL/DDBJ/PIR/SwissProt/Genseq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	JP, 2000-86699, A, (生化学工業株式会社), 28. 3月. 2000(28. 03. 00), 特許請求の範囲、実施例等参照, & CA, 2264509, A & US, 6245897, B	1-7, 18-19, 21
P, A	Shunji Sugawara et al., "Proteolysis of Human Monocyte CD14 Cysteine Proteinases (Gingipains) from Porphyromonas gingivalis Leading to Lipopolysaccharide Hyporesponsiveness" J. Immunol., Vol. 165(1), p. 411-418(2000)	1-7
A	JP, 10-505839, A, (ザ・スクリップス・リサーチ・インスティチュート), 9. 6月. 1998(09. 06. 98), 特許請求の範囲、実施例等参照, & WO, 98/2311, A1 & EP, 956957, A	1-7, 18-19, 21

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 06. 01

国際調査報告の発送日

10.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N 9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

國際調查報告

国際出願番号 PCT/JP01/02869

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Trude H. Flo et al., "Human Toll-Like Receptor 2 Mediates Monocyte Activation by Listeria monocytogenes, But Not by Group B Streptococci or Lipopolysaccharide" J. Immunol., Vol. 164(4), p. 2064-2069 (2000)	1-7
A	WO, 99/61468, A1, (GEMMA BIOTECHNOLOGY LTD.), 2. 12月. 1999 (02. 12. 99) 特許請求の範囲、実施例等参照, & EP, 1080111, A2 & AU, 9940258, A & BR, 9910725, A	8-11
A	US, 5705398, A, (The Scripps Research Institute), 6. 6月. 1999 (06. 06. 99), 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	6, 8-13, 18-19, 21
A	US, 5543303, A, (Sanna M. Goyert), 6. 8月. 1996 (06. 08. 96) 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	6, 8-19, 21

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求の範囲 20 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

前記請求の範囲に記載の「スリーニング」方法で得られた抗CD14抗体、CD14改変体若しくは低分子化合物について、明細書の記載を参考しても、具体的にはどのような阻害剤又は化合物が含まれ、どのような阻害剤又は化合物が含まれないのかが全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

)

)